



Rita Paiva Fernandes Rodrigues Martins

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento de um processo de
adsorção/dessorção para a purificação de um
extrato natural rico em hidroxitirosol**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dra. Ana Vital Morgado Marques Nunes, Investigadora
REQUIMTE, FCT/UNL

Co-orientador: Mestre Maria Franco Portugal da Costa Romeu, Empresa
Zeyton Nutraceuticals



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2019

Rita Paiva Fernandes Rodrigues Martins

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento de um processo de
adsorção/dessorção para a purificação de um
extrato natural rico em hidroxitirosol:**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dra. Ana Vital Morgado Marques Nunes, Investigadora
REQUIMTE, FCT/UNL

Co-orientador: Mestre Maria Franco Portugal da Costa Romeu, Empresa
Zeyton Nutraceuticals

Júri:

Presidente: Professora Maria da Ascensão Reis

Arguente: Professor José Paulo Mota

Vogal: Professora Doutora Ana Vital Morgado Marques Nunes

Março de 2019

Copyright

Processo de adsorção/dessorção para a captura de um extrato natural rico em hidroxitirosol: Implementação/otimização do processo *em coluna de adsorção*

Copyright © 2019 – Rita Paiva Fernandes Rodrigues Martins e Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer ao Professor Doutor Manuel Nunes da Ponte e à Doutora Ana Nunes por me darem a oportunidade de fazer parte do desenvolvimento deste projeto e por toda a disponibilidade e transmissão de conhecimentos, no decorrer desta etapa. De seguida, agradeço à Maria Romeu a orientação dada, à Doutora Gosia pelos seus conselhos e disponibilidade em ajudar no percalço da queda do termómetro no laboratório, ao Miguel Sousa pela partilha e companheirismo ao longo desta etapa.

Queria agradecer ao Nuno Costa e ao Rodrigo pela realização das amostras de HPLC- UV, e pela disponibilidade apresentada aquando o surgimento de algumas dúvidas. Ao professor Marco Silva e à Flávia pelo apoio e realização das amostras em GC, à dona Palminha por toda a amabilidade e material emprestado.

Agradeço também ao meu namorado, João Viana, e à “Elite Beige”, por serem um grupo de amigos incrível, por todo o incentivo e apoio que me deram nas etapas mais complicadas no decorrer deste trabalho.

Por último, um gigante agradecimento aos melhores pais do mundo.

Resumo

O hidroxitirosol é um composto fenólico derivado da azeitona, com uma vasta aplicabilidade na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica. O presente trabalho incidiu sobre o desenvolvimento de um processo de adsorção/dessorção em coluna, utilizando uma resina polimérica Amberlite XAD-4, com o objetivo de purificar um extrato natural rico em hidroxitirosol. Em particular pretendia-se a eliminação de hidratos de carbono e recuperação de hidroxitirosol. Neste contexto, estudou-se a influência de diversos parâmetros operatórios na eficiência da separação, como sejam, o caudal, tempo de adsorção/dessorção, e o tipo de solvente.

Observou-se que, ao contrário do reportado na literatura, é possível separar os hidratos de carbono do hidroxitirosol logo no passo de adsorção. De facto, para a composição do extrato natural estudado, é possível saturar rapidamente a resina em hidroxitirosol (~50g/g), deixando grande parte dos hidratos de carbono em solução. Por outro lado, no passo de dessorção da resina é possível dessorver preferencialmente o hidroxitirosol utilizando apenas água. Este resultado foi bastante surpreendente, uma vez que na bibliografia se refere sempre a necessidade de utilização de etanol.

A dessorção da resina com etanol acelera efetivamente a recuperação do hidroxitirosol, mas também dos hidratos de carbono, desfavorecendo assim a separação. No final deste trabalho conseguiu-se obter um processo com uma taxa de recuperação de hidroxitirosol de 86% e com um rácio de HT/HC de 11, que compara com um rácio inicial de HT/HC de 4.

Foi paralelamente avaliado o comportamento e a eliminação, de quatro compostos voláteis causadores de odores indesejáveis no concentrado de osmose inversa. Através do processo de adsorção/dessorção em coluna conseguiu-se eliminar totalmente o creosol e o 4-etilfenol, percentagem de eliminação do acético e butírico foi de 73% e 41%, respetivamente.

Palavras-Chave: Hidroxitirosol, hidratos de carbono, adsorção, dessorção, compostos voláteis

Abstract

Hydroxytyrosol is a phenolic compound derived from olives and it is vastly used by the food, cosmetic and pharmaceutical industry. The present work is focused on the development of a adsorption/desorption column process using an amberlite XAD-4 polymer resin with the goal of purifying a natural of a hydroxytyrosol enriched extract. The goal intended was the elimination of carbon hydrates and the retrieval of hydroxytyrosol. In this context, it was studied the influence of multiple operational parameters for the efficiency of the separation, such as, the flow, the adsorption/desorption times and the solvent type.

It has been observed, contrary from what is reported in the literature, that it is possible to separate carbon hydrates from the hydroxytyrosol as soon as the adsorption step. In fact, for the natural extract composition studied, it is possible to quickly saturate the resin in hydroxytyrosol (~50g/g), leaving in solution a big part of the carbon hydrates.

On the other hand, it is possible to preferably desorb the hydroxytyrosol using only water, in the resin desorption step. This result was quite surprising since it is referred on the bibliography that ethanol is required to accomplish this process. The resin desorption with ethanol effectively accelerates the hydroxytyrosol recuperation, but also the carbon hydrates, disfavoring the separation.

With the present work it was possible to obtain a process with a hydroxytyrosol recovery rate of 86% and an HT/HC ratio of 11, which can be compared with the HT/HC initial ratio of 4.

There were parallel evaluations of the behavior and elimination of four volatile compounds that cause unpleasant smells in the reverse osmosis concentrate. The process of adsorption/desorption enabled the complete elimination of creosol and 4-ethylphenol, and the percentages of elimination of acetic acid and butyric acid were 73% and 41% respectively.

Keywords: Hydroxotyrosol, carbohydrates, adsorption, desorption, volatile compounds

Índice

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract.....	XI
Índice de figuras.....	XIV
Índice de tabelas	XVI
Lista de abreviaturas e siglas	XIX
1 Introdução.....	1
1.1. Produção de azeite, subprodutos e impacto ambiental	1
1.1.1. Impacto ambiental	3
1.1.2. Indústria de extração do bagaço	4
1.2. Valorização de compostos fenólicos presentes no bagaço de azeitona	5
1.3. Atividade biológica dos polifenóis do azeite.....	6
1.4. Zeyton <i>Nutraceuticals</i> : Produção de extratos naturais de hidroxitirosol a partir do bagaço da azeitona	7
1.5. Objetivo desta dissertação	8
2 Adsorção.....	9
3 Materiais e Métodos	13
3.1. Materiais	13
3.1.1. Concentrados de osmose inversa.....	13
3.1.2. Resina Ambertlite XAD 4.....	14
3.1.3. Padrões, Reagentes e solventes	16
3.2. Metodologia	16
3.3. Métodos analíticos.....	21
3.1.1. Cromatografia gasosa	21
3.3.2. Quantificação de fenóis totais	21
3.3.3 Fenol sulfúrico.....	23
3.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	24
4 Apresentação e discussão de resultados	27
4.1 Avaliação da estabilidade do concentrado de osmose inversa (RO163)	27

4.2	Adsorção/dessorção em <i>batch</i> e evaporação e concentração de extratos	28
4.3	Adsorção/dessorção em coluna	32
4.3.1.	Análise dos compostos voláteis	45
4.4	Simulação do processo <i>batch</i> em coluna	48
5	Conclusão	53
6	Limitações e perspectivas de trabalho futuro	55
7	Bibliografia.....	57
8	Anexos	61
A.	Cromatografia líquida de alta eficiência	61
B.	Método de Folin-Ciocalteu e correlações	64
C.	Método de fenol-sulfúrico – Reta de calibração e concentração de amostras	67
D.	Processo de adsorção/dessorção em batch	70
E.	Processo de adsorção em semi- contínuo	74

Índice de figuras

Figura 1.1 - Toneladas de azeite produzidas em Portugal desde 2008 a 2017	1
Figura 1.2 - Diagrama ilustrativo dos três processos de extração do azeite. (A) Método Tradicional, (B) Extração de três fases, (C) Extração de duas fases	2
Figura 1.3 - Estrutura química de álcoois fenólicos presentes no bagaço de azeitona.....	6
Figura 1.4 - Esquema representativo do processo de produção do concentrado de osmose inversa, implementado pela Zeyton Nutraceuticals.	7
Figura 3.1 – Aspeto físico do RO 163.	13
Figura 3.2- Aspeto físico atual da resina Amberlite XAD4	15
Figura 3.3 - Esquema base dos processos efetuados ao longo do trabalho.....	16
Figura 3.4 – Esquema ilustrativo da montagem do processo de adsorção/dessorção realizado em batch.....	18
Figura 3.5 – Montagem dos equipamentos, banho de refrigeração, rotavapor e banho de refrigeração, utilizados para o processo de evaporação, que permite obter um produto desodorizado e concentrado.	20
Figura 3.6 – Equipamento de HPLC utilizado no decorrer do trabalho.	25
Figura 4.1 – Avaliação da estabilidade do HT e do TY no concentrado de osmose inversa (RO 163).	27
Figura 4.2 – Representação esquemática do processo de adsorção/dessorção com as respetivas correntes assinaladas.	28
Figura 4.3 - Concentrações de ácido acético, HT, TY e HC, presentes no RO164.1, BIODSS não evaporado e BIODSS evaporado (produto final).	31
Figura 4.4 – Área dos picos de ácido acético, ácido butírico, creosol e 4-etilfenol presentes no concentrado de osmose inversa 164.1 e no BIODSS evaporado.	31
Figura 4.5 - Massa de HT adsorvida para tempos de adsorção de 40, 60, 90 e 110 minutos. ...	40
Figura 4.6 - Resultados obtidos para os processos de adsorção/dessorção do ensaio 6, 7, 9, 10 e 11.....	41
Figura 4.7 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 6.	43
Figura 4.8 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 7.	43
Figura 4.9 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 9.	44
Figura 4.10 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 10.	44
Figura 4.11 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 11.	45
Figura 4.12 - Massa em mg de ácido acético e ácido butírico presentes nas etapas de adsorção/dessorção em coluna dos ensaios 6, 7, 8, 9, 10 e 11.....	47

Figura 4.13 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo adsorvidas, adsorção em coluna com recirculo, do ensaio 1, 2 e 3.....	48
Figura 4.14 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo na etapa de adsorção em coluna com recirculo, do ensaio 4, 5 e 6.....	49
Figura 4.15 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo na etapa de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE, em coluna com recirculo, do ensaio 7.	50
Figura 4.16 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo na etapa de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE, em coluna com recirculo, do ensaio 8.	50
Figura 4.17 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo na etapa de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE, em coluna com recirculo, do ensaio 9.	51
Figura 8.1 - Reta de calibração do padrão de hidroxitirosol.	61
Figura 8.2 - Reta de calibração do padrão de tirosol.	62
Figura 8.3 - Cromatograma de HPLC referente ao hidroxitirosol e tirosol.....	63
Figura 8.4 - Reta de calibração do ácido gálico preparada em água.	64
Figura 8.5 - Reta de calibração do ácido gálico preparada na mistura BIOSOLVE 50.	65
Figura 8.6 - Reta de calibração de glucose preparada na mistura BIOSOLVE 50.....	67
Figura 8.7 - Reta de calibração de glucose preparada na mistura BIOSOLVE 70.....	68
Figura 8.8 - Reta de calibração de glucose preparada na em água.....	69

Índice de tabelas

Tabela 1.1- Principais inputs e outputs da linha de produção nos diferentes processos de extração de azeite.	3
Tabela 3.1 - Concentrados de osmose inversa (RO) e respetivas especificações do produto. .	14
Tabela 3.2 - Propriedades da resina XAD4	15
Tabela 3.3 - Reagentes, solventes e padrões	16
Tabela 3.4 – Condições operatórias utilizadas nos ensaios batch realizados.	18
Tabela 4.1 – Balanço mássico do ensaio 26 ao processo de adsorção/dessorção realizado em modo batch.....	29
Tabela 4.2 – Resultados obtidos, relativos ao HT, para o rendimento dos vários passos realizados pelo processo de adsorção/dessorção batch.	30
Tabela 4.3 – Média de 7 ensaios, relativos ao TY, realizados pelo processo de adsorção/dessorção batch.	30
Tabela 4.4 - Comparação das percentagens mássicas do ensaio 1 e 2 relativamente à etapa de adsorção e dessorção com água (com diferentes tempos no DSSH ₂ O).	33
Tabela 4.5 - Comparação das percentagens mássicas do ensaio 2 e 3 relativamente à etapa de adsorção e dessorção com água, com diferentes caudais.	34
Tabela 4.6 - Percentagens mássicas obtidas no ensaio 4 para a etapa de adsorção e dessorção.	34
Tabela 4.7 - Percentagens mássicas obtidas no ensaio 5 para a etapa de adsorção e dessorção com BIOSOLVE 70.....	35
Tabela 4.8 - Comparação das percentagens mássicas obtidas no ensaio 4 e 5 relativamente às etapas de adsorção e dessorção com diferentes percentagens de etanol na mistura BIOSOLVE.	35
Tabela 4.9 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 6 relativamente às etapas de dessorção com água e BIOSOLVE 50.....	36
Tabela 4.10 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 6 e 7 relativamente à etapa de dessorção com água.	37
Tabela 4.11 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 7 e 8 relativamente à etapa de dessorção com água.	37
Tabela 4.12 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 9 relativamente às etapas de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE 50.	38
Tabela 4.13 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 10 relativamente às etapas de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE 50.	39
Tabela 4.14 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 11 relativamente às etapas de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE 50.	39
Tabela 4.15 - Percentagens de eliminação do ácido acético, ácido butírico, creosol e 4-etilfenol, na dessorção com água e na dessorção com BIOSOLVE 50.	46
Tabela 8.1 - Área dos picos correspondentes a concentrações de hidroxitirosol padrão.	61

Tabela 8.2 - Área dos picos correspondentes a concentrações de tirosol padrão.	62
Tabela 8.3 - Absorvâncias medidas para concentrações conhecidas de ácido gálico preparadas em água.	64
Tabela 8.4 - Absorvâncias medidas para concentrações conhecidas de ácido gálico preparadas na mistura de solventes BIOSOLVE 50.	65
Tabela 8.5 - Absorvâncias medidas para as concentrações conhecidas de glucose para a mistura BIOSOLVE 50.	67
Tabela 8.6 - Absorvâncias medidas para as concentrações conhecidas de glucose para a mistura BIOSOLVE 70.	68
Tabela 8.7 - Absorvâncias medidas para concentrações de glucose conhecidas.	69
Tabela 8.8 - Média de absorvâncias, fenóis totais pelo método de Folin, HT e TY pelo método de HPLC e hidratos de carbono pelo método Fenol-Sulfúrico.	70
Tabela 8.9 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 23 realizado em modo batch.	71
Tabela 8.10 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 24 realizado em modo batch.	71
Tabela 8.11 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 25 realizado em modo batch.	72
Tabela 8.12- Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 27 realizado em modo batch.	72
Tabela 8.13 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 28 realizado em modo batch.	73
Tabela 8.14 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 29 realizado em modo batch.	73
Tabela 8.15 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 1 em coluna.	74
Tabela 8.16 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 3 em coluna.	74
Tabela 8.17 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 4 em coluna.	76
Tabela 8.18 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 5 em coluna.	76
Tabela 8.19 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 6 em coluna.	77
Tabela 8.20 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 7 em coluna.	78
Tabela 8.21 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 8 em coluna.	79
Tabela 8.22 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 9 em coluna.	80

Tabela 8.23 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 10 em coluna.....	81
Tabela 8.24 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 11 em coluna.....	82

Lista de abreviaturas e siglas

ADS – Processo de adsorção/ dessorção

AcOH – Ácido acético

BIODSS – Produto final do processo de adsorção/dessorção com BIOSOLVE

BIOSOLVE 50 – Mistura de solventes biocompatíveis com 50% de etanol

BIOSOLVE 70 – Mistura de solventes biocompatíveis com 70% de etanol

DSS não evap – Dessorvido não evaporado

DSS evap – Dessorvido evaporado

DSS H₂O – Dessorvido com água

DSS BIOSOLVE 50 – Dessorvido com uma mistura de solventes que contém 50% de etanol

DSS BIOSOLVE 70 – Dessorvido com uma mistura de solventes que contém 70% de etanol

EtOH – Etanol

GAE – Equivalente em ácido gálico (*acid gallic equivalent*)

GC – Cromatografia gasosa

GE – Equivalente em glucose (*glucose equivalent*)

HC – Hidratos de carbono

HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência

HT – Hidroxitirosol

NADS – Não adsorvido

RO – Concentrado de osmose inversa

RO163- Concentrado de osmose inversa nº163

RO164.1- Concentrado de osmose inversa nº164.1

TY – Tirosol

1 Introdução

1.1. Produção de azeite, subprodutos e impacto ambiental

Na Europa, a produção de azeite constitui um importante setor agrícola localizado principalmente em países e zonas ribeirinhas do Mar Mediterrâneo. A Europa representa cerca de 80% da produção mundial, sendo também o maior consumidor com uma fatia de aproximadamente 70% do consumo global. [1]

Portugal é neste momento o sétimo maior produtor mundial e o quarto mais exportador. Os maiores domínios de oliveiras do país encontram-se na região do Alentejo, que representa 50% da área total de olivicultura, seguida de Trás-os-Montes (22%), Centro (18%); Ribatejo (7,7%) e Algarve (2,3%). [2], [3],[4]

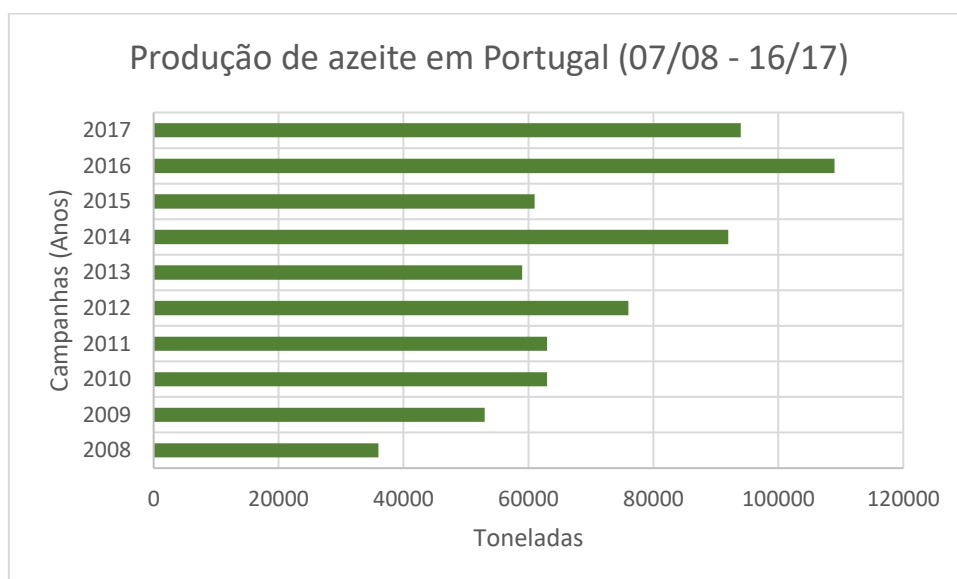


Figura 1.1 - Toneladas de azeite produzidas em Portugal desde 2008 a 2017

O processo de separação e recolha de óleo das azeitonas é denominado extração de azeite. A qualidade e a homogeneidade do óleo dependem de vários fatores como a origem das azeitonas, do tempo de colheita, o método de extração utilizado, entre outros. Existem atualmente 3 sistemas para obtenção do azeite, sistema clássico também chamado de prensas e o sistema contínuo, que é considerado tecnologicamente mais complexo do que o referido primeiramente. O sistema contínuo pode abranger na sua função duas ou três fases. O sistema de três fases tem como principal desvantagem a utilização de grandes quantidades de água, da qual resulta uma redução da quantidade de fenóis no azeite, bem como volumes maiores de

efluentes no final do processo. O sistema de duas fases surge posteriormente no sentido de tentar colmatar o excesso de resíduos (águas ruças, neste caso) e os elevados gastos de água, que advêm do sistema de três fases. No sistema de duas fases, não existe adição de água no processo, o resíduo resultante é o bagaço de azeitona com um elevado teor de humidade.[5] As etapas de ambos os sistemas estão esquematizadas no diagrama da **Figura 1.2**.

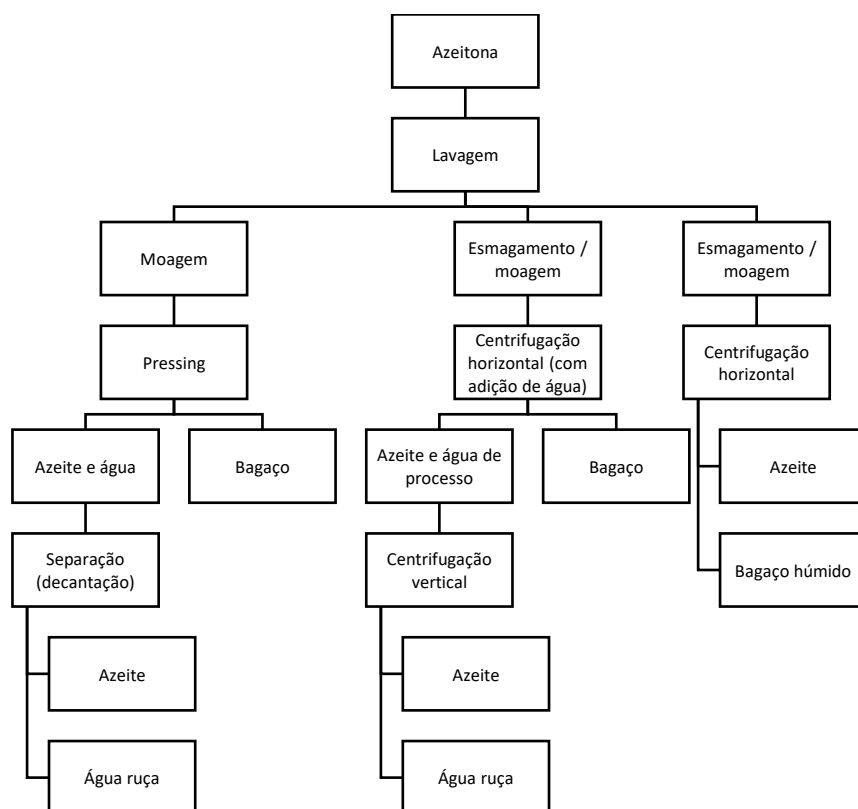


Figura 1.2 - Diagrama ilustrativo dos três processos de extração do azeite. (A) Método Tradicional, (B) Extração de três fases, (C) Extração de duas fases [1]

Como consequência dos processos de extração do azeite são gerados significativos subprodutos não desejáveis, em vastas quantidades, sendo que os mais impactantes são as águas ruças e o bagaço de azeitona.

O bagaço de azeitona, como referido anteriormente é um subproduto obtido durante a extração do azeite. Este compreende a água de constituição da azeitona, a água de adição (exceto no sistema de 2 fases), lavagem e uma percentagem variável de produto sólido (30 a 35% de película e polpa e 30 a 35% de pedaços de caroço). A quantidade de água presente neste subproduto depende muito dos sistemas de extração utilizados. O bagaço de azeitona pode considerar-se o único resíduo produzido, se o sistema adotado for o sistema de duas fases.

Por outro lado, as águas ruças são o resíduo maioritário, quando o sistema utilizado para a extração do azeite é o sistema tradicional. As águas ruças, apresentam uma grande heterogeneidade no que respeita à sua composição, embora se possa dizer que, em geral, é um efluente ácido, composto por água (83 a 94%), matéria orgânica (4 a 18%) e sais minerais (0,4 a 2,5%), sendo os seus principais constituintes orgânicos os lípidos, os açúcares, os poliálcoois, os polifenóis, os ácidos voláteis e as pectinas. Na **Tabela 1.1** consta um resumo das quantidades produzidas em cada um dos processos. [6]

Tabela 1.1 - Principais inputs e outputs da linha de produção nos diferentes processos de extração de azeite. [6]

Processo	Input		Output	
Prensa tradicional	Azeitona	1000 kg	Azeite	200 kg
	Água de lavagem	0.1–0.12 m ³	Bagaço	400 kg
	Energia	40 –63 kW.h	Água ruça	600 kg
Decanter 3 fases	Azeitona	1000 kg	Azeite Bagaço Água ruça	200 kg 500–600 kg 1000 –1200 kg
	Água de lavagem	0.1–0.12 m ³		
	Água adicionada ao decanter	0.5 –1 m ³		
	Água para limpeza do azeite	0.01 m ³		
	Energia	90–117 kW.h		
Decanter 2 fases	Azeitona	1000 kg	Azeite Bagaço	200 kg 800-950 kg
	Água de lavagem	0.1–0.12 m ³		
	Energia	< 90–117 kW.h		

No sistema de duas fases, que é o mais comum, e também aquele que produz maiores quantidades de bagaço, para produzir 15 kg de azeite geram-se 80 kg de bagaço húmido. Em Portugal no ano de 2017, produziram-se 90 000 toneladas de azeite, o que gerou cerca de 480 000 toneladas de bagaço.

1.1.1. Impacto ambiental

A produção anual de resíduos resultantes da extração do azeite, é estimada em 30 milhões de m³. Uma vez que a indústria oleica promove elevadas quantidades de efluentes e estes têm-se revelado um grave problema ambiental, torna-se perentória a sua mitigação, sendo necessário encontrar uma gestão apropriada e eficiente. [7]

Os resíduos são frequentemente dispostos em tanques de evaporação ou outros recetores ambientais e causam problemas como odor incómodo forte, contaminação do solo, inibição do crescimento das plantas, poluição de riachos naturais, bem como efeitos severos para a fauna aquática e para o sistema.

Os efluentes produzidos pelas indústrias oleicas são efetivamente um problema, que se torna mais gravoso, quando estes são despejados no meio ambiente sem dar a devida atenção aos cuidados necessários, devido à sua alta carga orgânica e ampla gama de contaminantes, incluindo poluentes organo-halogenados, ácidos gordos, compostos fenólicos. A alta natureza fenólica dos resíduos, juntamente com o seu conteúdo orgânico faz com que tenham pobre biodegradabilidade e alta fitotoxicidade, provocada pela presença de compostos fenólicos. Da mesma forma, a presença de açúcares reduzidos pode estimular a respiração microbiana e reduzir as concentrações de oxigénio dissolvido, diminuindo assim a quota disponível para outros microrganismos. Outro efeito prejudicial é que durante a deterioração dos resíduos, podem resultar altas concentrações de fósforo, que são responsáveis pela aceleração do crescimento de algas e conduzir à eutrofização.[8],[9]

Hoje em dia, existem inúmeros processos que são aplicados e visam precisamente minimizar os impactos causados. Processos físicos são tipicamente aplicados como uma etapa de pré-tratamento para remover os sólidos contidos, nas águas ruças. Os térmicos são utilizados para remover a água e condensar os fluxos de resíduos, no entanto, são ineficazes devido ao custo operacional requerido. Apesar de eficazes, processos avançados de oxidação são também muito dispendiosos. Os métodos físico-químicos, tais como neutralização, adsorção e precipitação são relativamente baratos, contudo não diminuem de modo eficaz a carga de poluição presente nos resíduos. [6]

1.1.2. Indústria de extração do bagaço

A indústria de extração do óleo do bagaço tem-se desenvolvido muito nos últimos anos. A fábrica transformadora de bagaço tem dois principais produtos, o óleo de bagaço que depois é enviado para uma refinaria e o bagaço extratado que normalmente é utilizado pela própria fábrica para a queima ou então depois é comercializado.

Estas indústrias têm uma unidade de secagem que diminui a percentagem de humidade do bagaço, este depois de seco passa por uma transformação física, obtendo no final uma massa granulada para ser extraída. A extração é feita com hexano, uma vez que este tem capacidade para dissolver o óleo presente no bagaço.

1.2. Valorização de compostos fenólicos presentes no bagaço de azeitona

O crescimento expansivo do negócio do azeite e a crescente preocupação ambiental associada a este tipo de resíduos, faz com que se avalie a aplicabilidade de diversas técnicas, não só de combate à poluição e tratamento, mas também na valorização dos compostos presentes nestes subprodutos que derivam da extração do azeite. Nos últimos anos muitos esforços têm sido realizados no sentido de encontrar uma forma de valorizar eficientemente as águas residuais dos lagares de azeite e o bagaço de azeitona húmido, de modo a conseguir acrescentar valor comercial a estes resíduos. Cerca de 98% dos compostos fenólicos da azeitona, perdem-se ao longo do processo de extração ficando na sua grande maioria no bagaço de azeitona. Uma das formas de valorização do bagaço, passa pela recuperação de compostos antioxidantes naturais de elevado valor. Apesar da composição do bagaço ser variável, condição dependente de vários fatores (exposição solar, condições de cultivo, temperatura), o bagaço proveniente do sistema de extração de duas fases é dos que mais compostos fenólicos apresenta na sua constituição, ou seja, se por um lado é nefasto a nível ambiental por outro, a sua alta concentração em polifenóis, faz com que seja um subproduto com potencial valor elevado. [10]

Os fenóis extraídos dos resíduos são cada vez mais comercializados para aplicações nutracêuticas, dietéticas e cosméticas devido às suas excecionais propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Vários estudos epidemiológicos correlacionaram a baixa incidência de doenças coronárias, aterosclerose e alguns tipos de cancro com o consumo de azeite na dieta mediterrânea. Estudos clínicos e bioquímicos estão em andamento para avaliar o seu desempenho no tratamento de doenças neurodegenerativas graves.

No âmbito desta tese, o estudo recaiu sobre a extração do hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol ou 3,4-DHPEA) e tirosol, (p-hidroxifeniletanol ou p-HPEA) ambos pertencentes à classe de álcoois fenólicos hidrofílicos mais abundantes no azeite. O hidroxitirosol é produzido a partir da hidrólise da oleuropeína, enquanto o tirosol é um produto formado por hidrólise do ligstrosídeo. A concentração total de hidroxitirosol no azeite varia entre 1,4 a 14,42 mg/kg no azeite extra virgem, enquanto que no azeite refinado a concentração média é cerca de 1,74 mg/kg. [10], [11],[12], [13]

Na Figura 1.3 é apresentada a estrutura molecular do hidroxitirosol e tirosol.

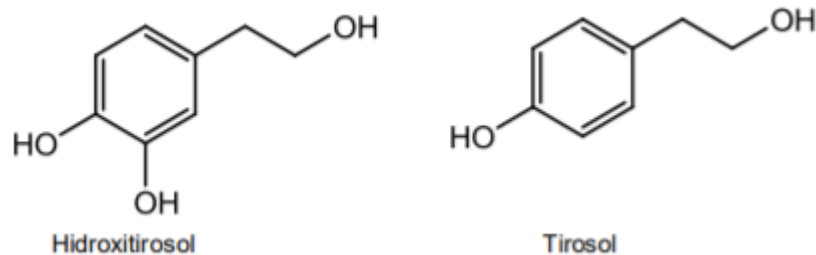


Figura 1.3 - Estrutura química de álcoois fenólicos presentes no bagaço de azeitona.

1.3. Atividade biológica dos polifenóis do azeite

A dieta mediterrânea está associada a uma menor incidência de aterosclerose, doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro. Os aparentes benefícios para a saúde têm sido parcialmente atribuídos ao consumo de azeite virgem pelas populações mediterrâneas. O interesse mais recente concentrou-se nos compostos fenólicos biologicamente ativos naturalmente presentes nos azeites virgens. Estudos (humanos, animais, *in vivo* e *in vitro*) mostraram que os fenólicos do azeite têm efeitos positivos sobre certos parâmetros fisiológicos.

No final de 2011, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) aprovou uma alegação de saúde sobre os fenóis do azeite, da seguinte forma: “Os fenóis do azeite contribuem para a proteção dos lípidos do sangue do *stress* oxidativo”. A alegação só pode ser utilizada para azeite contendo pelo menos 5 mg de hidroxitirosol (e seus derivados oleuropeína e tirosol) por 20 g de azeite. [14]

Até hoje, mais de 50 biofenóis e compostos relacionados foram identificados nos resíduos de produção de azeite. A oleuropeína e alguns dos seus derivados nomeadamente o tirosol (TY) e o hidroxitirosol (HT) são os mais abundantes (entre 60 e 80% do total de compostos fenólicos), dependendo do olival e da origem geográfica. O hidroxitirosol em particular, tem recebido muita atenção da comunidade científica pelos seus efeitos biológicos, estando a sua atividade antioxidante associada à prevenção do *stress* oxidativo, menores riscos de alguns tipos de cancro e doenças coronárias, na modulação da atividade de algumas enzimas específicas, bem como no seu potencial como agente antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório. [15]

1.4. Zeyton *Nutraceuticals*: Produção de extratos naturais de hidroxitirosol a partir do bagaço da azeitona

Tendo em conta o potencial destes compostos, os diversos estudos científicos, a abundância da matéria prima em questão (bagaço de azeitona), e a facilidade ao seu acesso, surge a empresa *Zeyton Nutraceuticals*.

Sendo o foco o tratamento do bagaço de azeitona, de modo a conseguir o reaproveitamento de extratos naturais ricos em hidroxitirosol (HT), e posterior incorporação dos mesmos, na indústria alimentar e farmacêutica.

A empresa, desenvolveu e continua a desenvolver os seus processos patenteados, em colaboração com a *REQUIMTE* (especificamente com o grupo de investigação de Química Verde da Universidade Nova de Lisboa). A *Zeyton* patenteou um processo para a obtenção de um extrato natural concentrado em HT, o qual compreende três etapas: extração, nanofiltração e osmose inversa. [16]

A primeira etapa consiste na extração do bagaço de azeitona (obtido pelo sistema de duas fases) com água, resultando uma fase aquosa rica em HT. Na segunda etapa alimenta-se a unidade de nanofiltração, com a fase aquosa retirada na primeira etapa. O objetivo desta é separar o HT e os outros compostos bioativos dos restantes, uma vez que estes apresentam baixo peso molecular acabam por atravessar a membrana ficando do lado do permeado, enquanto os de elevado peso molecular, ficam retidos na membrana. Por fim faz-se passar o permeado, da etapa a jusante, numa unidade de osmose inversa, a qual tem o objetivo de aumentar a concentração de HT. Na **Figura 1.4** encontra-se um esquema representativo do processo implementado pela empresa em questão.

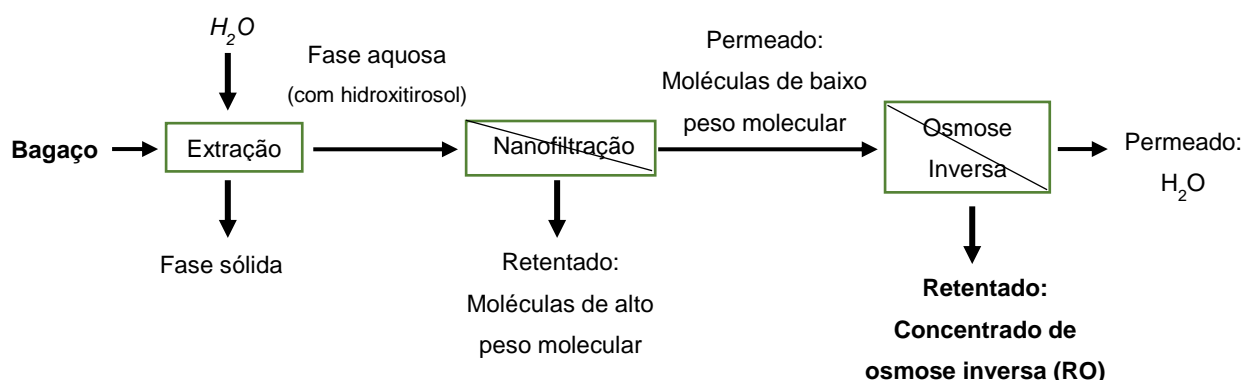


Figura 1.4 - Esquema representativo do processo de produção do concentrado de osmose inversa, implementado pela *Zeyton Nutraceuticals*.

É de salientar que este procedimento é realizado por meio de tecnologias limpas. No desenvolver deste trabalho o concentrado de osmose inversa (RO) utilizado provém deste processo.

Num trabalho recente realizado por Marta Marques e Maria Romeu, estudou-se o desenvolvimento do processo de adsorção em *batch* para posterior purificação deste extrato de osmose inversa.[17],[18]

1.5. Objetivo desta dissertação

Esta tese foi desenvolvida na empresa *Zeyton* Nutraceuticals e tem como principal objetivo o desenvolvimento de um processo de adsorção/dessorção que seja eficiente na separação entre o hidroxitirosol e os hidratos de carbono. O ideal seria alcançar um rácio de HT/HC igual ou superior a 10, pois a partir deste rácio a qualidade do produto já não é comprometida. Avaliou-se também o comportamento dos compostos voláteis (creosol, 4-etilfenol, ácido butírico e ácido acético) ao longo das etapas de adsorção/dessorção.

2 Adsorção

Para extrair polifenóis, entre eles o hidroxitirosol (HT), das águas resultantes dos resíduos da produção do azeite vários métodos tem sido propostos, sendo a maioria baseados no uso de misturas de solventes orgânicos e inorgânicos capazes de extrair estes compostos de elevado valor acrescentado. [19],[20]

A adsorção é a ligação de compostos dissolvidos (adsorvato) num meio sólido (adsorvente) resultante das interações das moléculas de adsorvato com os micro e macroporos, e permite a remoção seletiva de compostos em soluções diluídas. Comparando com tecnologias concorrentes, a adsorção é procurada pela sua simplicidade no *design*, operação e *scale up* e pela elevada capacidade para operar com caudais elevados. Outros fatores a favor são a facilidade de regeneração, baixo custo associado e a utilização de solventes não tóxicos. [21]

Os fenómenos de adsorção resultam da atuação de forças físicas (também chamado fisissorção) e/ou químicas (conhecido por quimissorção). Na adsorção física as moléculas aderem à superfície do adsorvente por forças relativamente fracas, maioritariamente forças de *Van der Waals* (interação dipolo-dipolo e forças de polarização envolvendo dipolo induzido). Nesta adsorção as energias libertadas são relativamente baixas (da ordem de 5 a 10 kcal/mol) quando comparadas com as energias libertadas na adsorção química. A adsorção física é reversível, não localizada (ocorre em toda a superfície do adsorvente) e pouco específica e não ocorrem alterações moleculares das substâncias envolvidas, devido a esse facto o adsorvente não é alterado quimicamente, necessitando apenas de ser regenerado antes da próxima utilização. Na adsorção química existem ligações químicas mais fortes, como por exemplo covalentes ou pontes de hidrogénio, o processo é irreversível e localizado (só ocorre nos centros ativos). [22]

São vários os fatores que podem influenciar o processo de adsorção como as propriedades do adsorvente (área superficial, tamanho do poro, densidade, grupos funcionais presentes na superfície, hidrofobicidade do material) e do adsorvato (polaridade, tamanho da molécula, solubilidade), a temperatura, natureza do solvente, o pH do meio e as condições operacionais. [23]

A curva de equilíbrio de adsorção é sem dúvida um requisito essencial para obtenção de informações relevantes sobre projeto e análise de um processo de separação por adsorção. Quando uma determinada quantidade de um sólido (adsorvente) é colocada em contato com um dado volume de líquido (adsorvato), com um soluto adsorvível, a adsorção ocorre até que o equilíbrio seja alcançado. A fase de equilíbrio é atingida quando a concentração de soluto na

fase líquida permanece constante, isto nada mais é do que a igualdade da velocidade em que as moléculas são adsorvidas/dessorvidas na superfície do adsorvente.

Segundo *Do et al* (1998) [24], o processo de adsorção tem três mecanismos dispares: estérico, cinético e de equilíbrio. No primeiro, o adsorvente possui poros com dimensões capazes de alojar pequenas moléculas. O mecanismo cinético baseia-se nas diferentes difusividades das distintas espécies químicas, que se encontram dentro dos poros do adsorvente. O mecanismo de equilíbrio tem em conta a aptidão dos diferentes adsorventes, para alojar preferencialmente determinados componentes dos adsorvatos. [24]

As isotérmicas de adsorção definem as interações entre o adsorvato e o adsorvente. A isotérmica de *Langmuir* é a das mais utilizadas e assume:

- Energia de adsorção uniforme ao longo de uma superfície homogénea de adsorvente;
- Afinidade igual em todos os pontos de adsorção;
- Não existem interações entre moléculas adsorvidas;
- Mecanismo de adsorção único;
- Formação de monocamada.

Contudo, na prática existem sempre vários tipos de locais de adsorção, bem como mecanismos de adsorção. Além disso, não é realista pensar em modelos de monocamada sem interação entre moléculas adsorvidas. [21]

A isotérmica de *Freundlich* é uma correlação empírica para modelos não ideais com superfícies muito heterogéneas. Esta isotérmica apresenta bons resultados para amplitudes de concentração restritas e não é obrigatório assumir a formação de monocamada. [21]

Os adsorventes mais utilizados, no caso do tratamento de águas provenientes da produção de azeite são carvão ativado, argilas ativadas e polímeros. Instalações com carvão ativado estão associadas a elevados custos de investimento / operação e as argilas, apesar de serem uma alternativa mais económica, apresentam rendimentos na remoção de polifenóis um pouco inferiores, quando comparados com os polímeros super adsorventes. Além disso, as resinas apresentam diversas vantagens:

- Permitem operar com caudais de alimentação superiores;
- Maior seletividade;
- Etapa de dessorção mais fácil;
- Possibilidade de reutilização;
- Baixo consumo de solvente;
- Ausência de resíduos químicos no produto final;
- Melhor relação custo-eficiência. [19]

Tal como referido anteriormente, existem vários parâmetros que afetam a capacidade de adsorção. Utilizando a resina XAD4, a adsorção de polifenóis é mais eficaz com pH ácidos, a temperatura não tem um efeito significativo neste processo, mas melhora a permeabilidade do líquido na resina, permitindo utilizar caudais mais elevados. Recomenda-se a utilização de caudais elevados de modo a aumentar a capacidade de produção e que não é necessário proceder à diluição da alimentação para que haja uma boa adsorção. [19]

Para uma maior eficiência no processo de tratamento das águas obtidos dos resíduos, é sugerido no estudo de *Petrotos et al.*(2012) [19] a utilização de um processo de adsorção de 3 passos, com 2 horas de duração cada, seguido de 1 hora de dessorção. No passo de dessorção é necessário um volume de uma solução de etanol (50% v/v) 3.46 vezes superior ao volume de resina utilizado. A adsorção tem esta duração pois foi determinado que, para as condições operacionais utilizadas, o equilíbrio era alcançado ao fim de 2 a 3 horas. [19]

No artigo realizado por *Zagklis et. al* (2015) [20] foram comparadas 3 resinas diferentes: XAD4, XAD16N e XAD7HP. As duas primeiras foram aquelas que apresentaram melhores resultados na adsorção de fenóis, bem como baixa seletividade para os hidratos de carbono, sendo que a melhor foi a XAD4. A isto se deve o facto de a superfície destes adsorventes ter sido desenhada para facilitar a adsorção de compostos polares, como é o caso dos fenóis. Por outro lado, a XAD7HP apresentou baixas taxas de adsorção em relação aos fenóis. [20]

No passo de dessorção foram utilizados água destilada, etanol e acetona. Aquando a utilização da água, cerca de 65% dos HC foram dessorvidos, bem como 25% dos fenóis. Por outro lado, o etanol foi praticamente seletivo para a remoção de fenóis, retirando 94% dos restantes na coluna de adsorção, enquanto que a acetona dessorveu tanto hidratos de carbono e fenóis, com eficiências de 100% e 80%, respetivamente. [20]

Atualmente, a adsorção de fenóis é utilizada, ou está a ser implementada, no tratamento de águas residuais industriais, remoção de inibidores em meios de fermentação, purificação de xaropes de açúcar e de produtos de fermentação, processamento de comida e bebidas, purificação de compostos fenólicos bioativos, entre outros. [21]

No entanto, muitos dos estudos de adsorção foram feitos em escala laboratorial, sendo necessário passar para escala piloto, de modo a proceder à sua otimização e avaliar a sua viabilidade a nível industrial. A combinação de etapas de adsorção com tecnologias convencionais e/ou emergentes pode ser a chave para se obter processos otimizados, flexíveis, efetivos e ecológicos. [21]

3 Materiais e Métodos

Nesta secção serão apresentados os materiais e métodos utilizados. Devido à existência de diversas soluções diferentes, durante este trabalho utilizam-se abreviaturas para as distinguir que podem ser consultadas na lista de abreviaturas. As mais importantes são : RO = matéria prima utilizada, obtida através do processo de osmose inversa; HT = hidroxitirosol; TY= tirosol; HC = hidratos de carbono; NADS = solução não adsorvida; BIOSOLVE = mistura de solventes biocompatíveis à base de etanol; BIODSS = produto obtido no final do processo de adsorção/dessorção.

3.1. Materiais

3.1.1. Concentrados de osmose inversa

A matéria prima usada no decorrer deste trabalho foi o concentrado de osmose inversa (RO), mais concretamente o RO 163 e 164.1.

Os RO em questão são originados a partir do processo patenteado [16], propriedade da *Zeyton Nutraceuticals*, descrito na **Secção 1.4**. Atualmente o processo para obtenção dos RO está a ser executado pela empresa AZAL- Azeites do Alentejo com sede em Redondo, Évora.

É importante referir que a variação das condições climatéricas e consequentemente oscilação de matéria-prima faz com que possa haver flutuações na composição dos RO.

Na **Figura 3.1** pode observar-se o aspeto físico do RO 163.

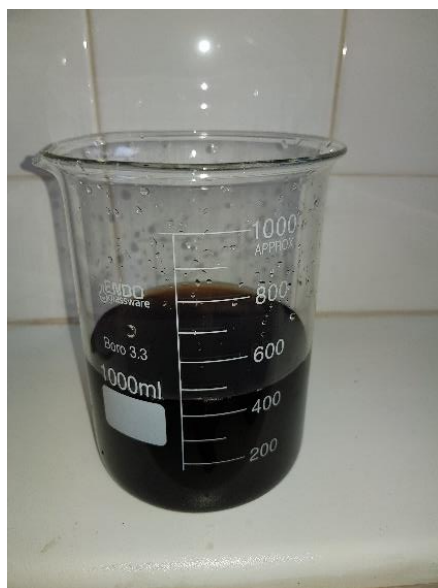


Figura 3.1 – Aspeto físico do RO 163.

Tabela 3.1 - Concentrados de osmose inversa (RO) e respectivas especificações do produto.

Característica do RO	Código de RO	
	163	164.1
Concentração de Hidratos de Carbono (mg/L)	≈2800	≈2600
Concentração de Hidroxitirosol (mg/L)	≈11000	≈13000
Concentração de Tirosol (mg/L)	≈2000	≈2000
Data de produção	17/06/2016	14/07/2016
Proveniência do RO	AZAL	AZAL
Tipo de acondicionamento	Bidão de plástico	Bidão de plástico
Temperatura de acondicionamento	5°C-30°C	5°C-30°C

3.1.2. Resina Ambertlite XAD 4

A única resina utilizada, ao longo do trabalho desenvolvido, como adsorvente foi a resina polimérica não iônica XAD 4. A escolha desta, foi baseada no artigo da literatura feito por *Zagklis et al. (2015)* [20]. Esta é um polímero reticulado de natureza aromática, ideal para adsorver compostos de peso molecular relativamente baixo. Devido à sua estrutura macro-reticular, apresenta uma excelente estabilidade química, física e térmica como adsorvente, bem como uma considerável área superficial. É vastamente usada na remoção de: compostos fenólicos e aromáticos, poluentes orgânicos presentes nas águas residuais, solventes clorados, herbicidas e pesticidas. Outra característica que merece destaque é a sua fácil regeneração, sendo que tal pode ser feita com um solvente miscível em água ou com metanol. [25],[26]

Na **Tabela 3.2** são apresentadas as características da resina XAD4.

Tabela 3.2 - Propriedades da resina XAD4

Matriz	Estireno-divinilbenzeno
Aspeto físico	Esferas brancas translúcidas¹
Área de superfície (m²/g)	≥ 750
Massa específica (kg/L)	1,02
Porosidade ⁽¹⁾ (mL/mL)	≥ 0,50
Tamanho da partícula (mm)	0,49-0,69

A **Figura 3.2** ilustra o aspeto físico atual da resina XAD4.



*Figura 3.2 - Aspeto físico atual da resina
Amberlite XAD4*

¹ A coloração da resina é branca, no entanto devido às sucessivas utilizações, apresenta atualmente uma coloração castanha.

3.1.3. Padrões, Reagentes e solventes

Na **Tabela 3.3** constam os respectivos CAS, grau de pureza e marca dos padrões, reagentes e solventes utilizados ao longo do trabalho.

Tabela 3.3 - Reagentes, solventes e padrões

Composto	CAS	Grau de Pureza (%)	Marca
Acetona	67-64-1	-	Labchem
Ácido Gálico	149-91-7	99	Alfa Aesar
Ácido Sulfúrico	7664-93-9	95-97%	Fluka
Carbonato de Sódio	497-19-8	99,5	Alfa Aesar
D(+)-glucose	50-99-7	99,5	Sigma-Aldrich
Etanol	64-17-5	96	Labchem
Fenol	108-95-2	99	Sigma-Aldrich
Hidroxitirosol	10597-60-1	≥ 98	ExtraSynthese
Reagente Folin-Ciocalteu	-	-	Sigma- Aldrich
Tirosol	501-94-0	98	Sigma-Aldrich

3.2. Metodologia

O processo de adsorção/dessorção realizado neste trabalho, tem como base ilustrativa a **Figura 3.3**. O processo foi testado em três modos de operação diferentes: semi-contínuo, *batch* e coluna com recirculo. Para cada um foram estudadas variáveis operatórias como tempo, caudal e a eficiência de cada etapa.

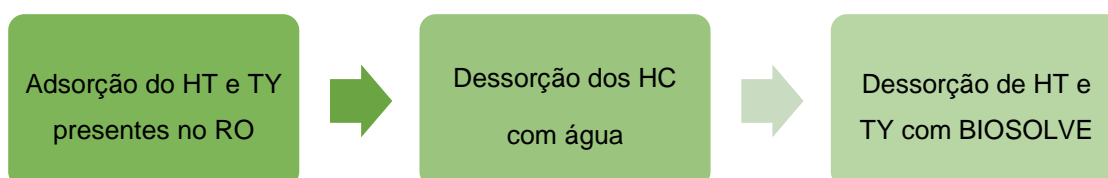


Figura 3.3 - Esquema base dos processos efetuados ao longo do trabalho.

Adsorção/dessorção em *batch* do concentrado de osmose inversa

O processo de utilizado foi adaptado do artigo *Zagklis et al. (2015) [20]*., cujo objetivo consiste na separação de hidratos de carbono e compostos fenólicos que se encontram presentes no RO (concentrado de osmose inversa).

O procedimento foi estabelecido no estudo executado e publicado por Marta Marques [17], e é composto por 3 etapas sequenciais.

Na primeira etapa processa-se 1.5 L de RO, este é vertido para um reator de plástico cilíndrico, que contém um filtro com 1.5 kg resina XAD-4 no seu interior. A parte superior do reator é aberta permitindo a introdução da alimentação (RO). A base do reator tem uma torneira que permite a descarga do líquido no fim de cada etapa. Em todos os passos o reator é colocado num *shaker* (*Edmund Buhler - Labolan*) a 70 rpm. A primeira etapa tem a duração de 3 horas, tendo como propósito a adsorção dos compostos fenólicos na resina. Após terem decorrido estas 3 horas, o efluente é retirado e armazenado para posterior análise. A resina permanece no filtro dentro do reator até ao final do processo. A segunda etapa, também esta com a duração de 3 horas, consiste na remoção de hidratos de carbono dessorvendo os mesmos da resina. Nesta fase o reator é alimentado com 4,5 L de água destilada. Após o término o efluente é retirado e analisado. Por último, alimenta-se o reator com 4.5 L de uma mistura de solventes biocompatíveis com 50% de etanol (mistura BIOSOLVE 50)², para que ocorra a dessorção dos compostos pretendidos (hidroxitirosol e tirosol). Esta etapa é a mais longa uma vez que é *overnight* (≈ 16h).

No final de cada ensaio a resina foi regenerada, para a sua posterior utilização. Para o efeito foram utilizados 2 solventes, etanol e água destilada. A regeneração consiste em duas etapas e demora na sua totalidade 2h, é feita com agitação realizada por meio de um *shaker* (*Edmund Buhler - Labolan*) a 70 rpm).

Na **Tabela 3.4** estão indicadas as condições operatórias dos ensaios *batch* realizados.

² Por motivos de confidencialidade, a mistura de solventes biocompatíveis é revelada apenas em parte.

Tabela 3.4 – Condições operatórias utilizadas nos ensaios batch realizados.

Parâmetros	Etapas		
	Adsorção do RO	Dessorção com H ₂ O	Dessorção com BIOSOLVE
Código efluente	NADS	DSS H ₂ O	BIODSS
Volume da alimentação (L)	1.5	4.5	4.5
Massa de resina utilizada (kg)	1.5	1.5	1.5
Duração (h)	3	3	16

Na **Figura 3.4** está representado o esquema de montagem do processo realizado em *batch*.



Figura 3.4 – Esquema ilustrativo da montagem do processo de adsorção/dessorção realizado em batch.

Adsorção/dessorção em coluna

Este processo é operado em coluna e o estudo preliminar teve início na tese de Maria Inês Henriques [27].

A instalação consiste numa coluna cilíndrica de vidro (de dimensões 20 mm x 290 mm) e uma bomba (Gilson – Minipuls 3). A coluna é empacotada com 20 g de resina XAD-4, com uma granulometria entre 0.250-0.84 mm. Os caudais usados nos vários ensaios, foram de 1.5, 2.5 e 5 mL/min. Analogamente ao que acontece na adsorção em *batch*, o primeiro passo da adsorção em coluna tem como objetivo a adsorção dos compostos fenólicos da matéria prima (RO). Posteriormente é realizada a dessorção com água para que sejam dessorvidos os hidratos de carbono, e por fim, procede-se à dessorção do produto rico em hidroxitirosol, utilizando uma mistura de solventes biocompatíveis. Em todas as etapas a quantidade de alimentação é variável, uma vez que esta vai depender do caudal e do tempo que se pretende operar.

No final de cada ensaio a resina foi regenerada, uma hora com a passagem de etanol e uma hora com a passagem de água destilada, ambas com um caudal de alimentação de 2,5 mL/min.

Processo em coluna com recirculo

O processo de adsorção/dessorção operado em coluna com reciclo, foi realizado pela primeira vez no âmbito desta tese. O objetivo é igual ao do processo em coluna sendo díspar apenas por este ser realizado com reciclo. Neste processo, em todas as etapas, a alimentação e a recolha são feitas num único recipiente. Foram testados vários caudais, com o intuito de averiguar se estarmos a tirar proveito do reciclo.

Todos os ensaios começaram com uma alimentação de concentrado de osmose inversa (RO) de 90 mL. O tempo de operação só se iniciava quando o RO, se encontrava na base da coluna. A opção por este tipo de procedimento advém do facto de a coluna se encontrar sempre com água, devido ao passo da lavagem aquando se efetua a regeneração da resina, anteceder sempre um novo ensaio. Também as etapas seguintes de dessorção com água e dessorção com a mistura de solventes biocompatíveis à base de etanol, são realizados com uma alimentação de 90 mL.

Evaporação de extratos

A evaporação de extratos foi realizada no final do processo de adsorção/dessorção com o objetivo de aumentar a concentração de hidroxitirosol e tirosol no produto final.

Para obtenção do pretendido, foi utilizado um rotavapor (VWR – IKA RV 10 digital), no qual se evaporou 4 vezes em volume, obtendo uma concentração de aproximadamente 8000 ppm. Colocou-se o dessorvido (BIODSS) num balão de fundo redondo, manteve-se a temperatura do banho a 40°C, as rotações a 95 rpm e a pressão de vácuo primeiramente a 80 mbar (durante aproximadamente uma hora) e depois a 40 mbar (durante aproximadamente duas horas). A bomba de vácuo utilizada foi uma VWR – CVC 3000 Vacuubrand e a temperatura de condensação foi de 5.6 °C, utilizando um banho de refrigeração VWR.

Foi ainda realizado um estudo de forma a avaliar o potencial da evaporação do BIODSS na eliminação de compostos voláteis como o ácido acético, o ácido butírico, o creosol e o 4-etilfenol.

A **Figura 3.5** ilustra a montagem do rotavapor.



Figura 3.5 – Montagem dos equipamentos, banho de refrigeração, rotavapor e banho de refrigeração, utilizados para o processo de evaporação, que permite obter um produto desodorizado e concentrado.

3.3. Métodos analíticos

3.1.1. Cromatografia gasosa

Para se proceder à quantificação dos compostos voláteis presentes no processo em estudo, mais especificamente o ácido acético, ácido butírico, creosol e 4-etilfenol, recorreu-se a um método amplamente utilizado na análise quantitativa e qualitativa de misturas, a cromatografia gasosa.

As amostras recolhidas ao longo do trabalho realizado que requerem ser analisadas, são colocadas em *vials* de vidro (cerca de 5 mL de amostra por *vial*), cuja tampa é metálica com um septo incorporado e seguidamente são colocadas no equipamento para análise.

As análises aos voláteis foram realizadas num sistema GC/MS, que consiste num cromatógrafo gasoso Bruker GC 456 acoplado a um espectrofotómetro de massa Scion TQ. O injetor automático utilizado foi CTC Analysis autosampler CombiPAL, os dados foram obtidos com MSWS 8.2 Bruker e analisados com Bruker MS Data Review 8.0. O injetor no modo splitless foi operado a 260°C durante 3 minutos. A separação para algumas amostras foi realizada em duas colunas ZB-WAX PLUS (60 m x 0,32 x, 1 µm df) ligada a uma coluna ZB-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm film df), para outras, foi utilizada uma coluna ZB-WAX PLUS (60 m x 0,32 x, 1 µm df) ligada a uma coluna ZB-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm df). A temperatura inicial do forno foi de 40°C durante 5 minutos, seguida de um aquecimento até 240°C a uma taxa de 4°C/min, permanecendo nesta temperatura durante 15 minutos. O gás de corrida utilizado foi hélio com um fluxo constante de 1,70 mL/min.

A temperatura da linha de transferência foi de 240°C, enquanto que a temperatura da fonte foi 220°C. Os iões foram analisados a 40-450 u.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas pelo laboratório *Lab Resolution* (FCT-NOVA).

3.3.2. Quantificação de fenóis totais

Existem inúmeras técnicas para quantificar os compostos fenólicos totais, uma das mais vastamente utilizada é o método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*, sendo que foi este que foi colocado em prática no presente trabalho, devido à sua simplicidade e baixo custo.

O método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, executado foi adaptado do protocolo microescala descrito por *Waterhouse et al.* (2002).[28]

O método baseia-se na interação das substâncias redutoras com o reagente *de Folin-Ciocalteu*. A composição química deste reagente inclui o ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que, originalmente, possuem coloração amarela. Um meio com pH alcalino propicia que substâncias redutoras, como as substâncias fenólicas, dissociem um próton, levando à formação do anião enolato. Este anião é capaz de reduzir o reagente de *Folin-Ciocalteu* formando óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}). Estes óxidos possuem coloração azul que é detetável na banda do espectro de 750 nm, possibilitando a quantificação dessas substâncias através da espectrofotometria. Assim sendo, a coloração final da amostra será indicadora da quantidade de substâncias fenólicas presentes na mesma, uma vez que esta apresenta um azul mais intenso quanto maior for a quantidade de compostos fenólicos.[29], [30], [28],[31]

Primeiramente foi preparada uma solução de carbonato de sódio, para tal pesaram-se 20 gramas de carbonato de sódio, adicionou-se 80 mL de água destilada num balão volumétrico de 100 mL e dissolveu-se o carbonato de sódio, no mesmo. Seguidamente colocou-se o balão numa placa de agitação quente e deixou-se levar à fervura. Após o arrefecimento do balão, adicionou-se água destilada até perfazer os 100 mL.

Quanto à elaboração das retas de calibração, foi necessário primeiramente preparar uma solução- padrão com ácido 3,4,5-triidrotribenzóico, mais vulgarmente conhecido como ácido gálico. Para a formulação das soluções foi necessário pesar 0.5 g de ácido gálico e posteriormente dissolver o mesmo em 10 mL de etanol. Seguidamente verteu-se a mistura para um balão volumétrico de 100 mL perfazendo o restante volume com água destilada, para uma das retas e com uma mistura de solventes biocompatíveis para a outra, obtendo-se assim duas soluções com uma concentração de 5g/L. A partir destas soluções padrão foram formuladas:

- Nove soluções de concentração 50; 100; 150; 350, 500, 650, 800, 900, 950 g/L, para a reta da água;
- Oito soluções de concentração 50, 100, 150, 250, 350, 500, 650, 800 g/L, para a reta da mistura de solventes biocompatíveis.

Foram pipetados, para um *vial*, 20 μ L da amostra/ soluções de ácido gálico/ branco/amostra, de seguida adicionaram-se 1,58 mL de água destilada e 100 μ L de reagente *Folin-Ciocalteu*. A mistura resultante foi incubada à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Após o término foram adicionados 300 μ L de uma solução de carbonato de sódio e agitou-se novamente. Os *vials* foram colocados, num banho de água a 40°C, durante 30 minutos, e por fim mediu-se a absorvância (a 750 nm) num espetrofotómetro (*Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer*). A concentração das amostras analisadas ao longo do trabalho, foi determinada através das retas de calibração do ácido gálico em mg/L GAE (*Galic Acid Equivalent*).

No **Anexo B** estão apresentados os gráficos das retas de calibração e respectivas tabelas com as absorvâncias.

3.3.3 Fenol sulfúrico

O método utilizado para quantificar os hidratos carbono ao longo das várias etapas do processo, foi o método do Fenol- Ácido sulfúrico. Este método para além de confiável é dos mais utilizados devido à sua simplicidade. O método foi ajustado de um protocolo modificado de *Masuko et al. (2004)*. [32]

Foi necessário primeiramente perfazer uma solução de fenol, pesando 5 gramas de fenol para posteriormente diluir em 100 mL de água destilada.

Para proceder à quantificação de hidratos de carbono foram elaboradas três retas de calibração, cuja concentração é expressa em g/L glucose equivalente (GE). Para tal foi necessário preparar três soluções padrão de D(+) glucose mono-hidratada, para três solventes diferentes, uma para a água e duas para a mistura de solventes biocompatíveis, com concentração de 1g/L. A partir destas soluções padrão foram formuladas:

- Oito soluções de concentração 0.005; 0.01; 0.025; 0.035; 0.05; 0.65; 0.085 e 0.1 g/L, para a reta da água;
- Nove soluções de concentração 0.005; 0.01; 0.025; 0.035; 0.05; 0.055; 0.06; 0.65 e 0.085 g/L, para a reta da mistura de solventes biocompatíveis;
- Seis soluções de concentração 0.005; 0.01; 0.025; 0.05; 0.65 e 0.085 g/L, para a reta da mistura de solventes biocompatíveis.

Para a formulação de cada uma delas, foram pipetadas, para tubos de ensaio, 500 µL de amostra, 1.5mL de ácido sulfúrico e 300 µL de solução aquosa (5% m/v) de fenol. Com o auxílio de um *vortex* (Vortex Mixer Labnet) os tubos foram agitados durante cerca de 5 segundos e posteriormente incubados num banho seco (Accu Block™ Digital Dry Bath) a 90°C, durante 10 minutos. Por último, a solução foi novamente agitada durante cerca de 5 segundos e colocada num banho de água, à temperatura ambiente.

As absorvâncias das soluções foram medidas a 490 nm com recurso a um espetrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer).

A concentração das amostras, retiradas ao longo do trabalho, foi determinada com recurso às retas de calibração da glucose em mg/L de glucose equivalente.

No **Anexo C** estão apresentados os gráficos das retas de calibração e respectivas tabelas com as absorvâncias.

3.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A quantificação de hidroxitirosol (*HT*) e tirosol (*TY*) livres contabiliza apenas as moléculas de HT e TY que não se encontram ligadas a outras moléculas.

A análise de HPLC foi utilizada para caraterizar o perfil fenólico (HT e TY) das várias amostras utilizando os equipamentos *Thermo Finnigan Surveyor HPLC System* e *Agilent Infinity 1100* com os softwares *Chemstation OpenLAB*, respetivamente. A coluna usada foi uma coluna *Waters Novapak C18* (150 x 3,9 mm). A temperatura da coluna foi mantida a 25°C. A fase móvel foi composta por 10% metanol e 2% ácido acético, em água ultra-pura Tipo I, numa só garrafa. As amostras foram corridas com um caudal de 0,5 mL/min, durante 15 minutos. A deteção e quantificação foram realizadas a um comprimento de onda de 280 nm. A reta de calibração foi analisada no início da corrida.

Foram preparadas soluções padrão de hidroxitirosol e tirosol com diferentes concentrações e determinaram-se as respetivas áreas de picos. De seguida, foram realizadas as retas de calibração das concentrações (mg/L) em função das áreas dos picos (UA).

No **Anexo A** estão apresentadas as tabelas com as áreas dos picos (tabelas 5.1 e 5.2) e as respetivas retas de calibração (figuras 5.1 e 5.2).

Finalmente, através do cromatograma, presente no **Anexo A**, foram determinados os tempos de retenção dos dois padrões. O hidroxitirosol possui um tempo de retenção \approx 4 minutos, que corresponde ao pico mais intenso, e o tirosol com um tempo de retenção \approx 6 minutos.

As equações das retas de calibração e os cromatogramas, no **Anexo A**, foram utilizados para calcular as concentrações de hidroxitirosol/ tirosol nas amostras.

A quantificação de ácido acético e ácido butírico nas amostras foi efetuada com uma coluna Aminex HPX-87C seguindo a metodologia descrita em *Chromatography Aminex HPLC Columns*. [34]

As análises de HPLC foram realizadas pelo laboratório de análises do LAQV-REQUIMTE.



Figura 3.6 – Equipamento de HPLC utilizado no decorrer do trabalho.

4 Apresentação e discussão de resultados

4.1 Avaliação da estabilidade do concentrado de osmose inversa (RO163)

Neste trabalho usou-se o concentrado de osmose inversa (RO) com os códigos 164.1 (durante 3 meses) e 163 (durante 3 meses). A estabilidade do concentrado de osmose inversa (RO 164.1), já foi provada anteriormente [27]. Assim sendo, e uma vez que a mesma ainda não tinha sido comprovada para o RO 163, no âmbito desta tese avaliou-se a estabilidade do mesmo, em relação ao hidroxitirosol (HT) e tirosol (TY). Para tal relação procedeu-se à análise de HPLC (Secção 3.3.4) destes dois compostos durante o período da realização deste trabalho.

Na **Figura 4.1** pode observar-se a estabilidade do hidroxitirosol (HT) e tirosol (TY) do RO163.

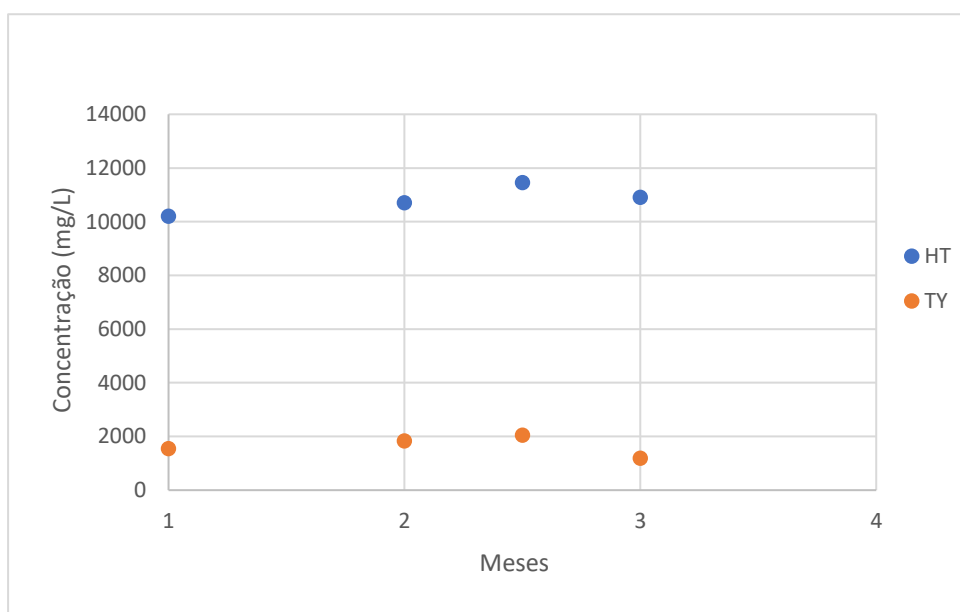


Figura 4.1 – Avaliação da estabilidade do HT e do TY no concentrado de osmose inversa (RO 163).

De acordo com a **Figura 4.1**, o HT e o TY demonstraram ser muito estáveis ao longo do tempo em estudo, sendo que o concentrado de osmose inversa 163 contém, aproximadamente, 11000 mg/L de HT e 2000 mg/L de TY.

4.2 Adsorção/dessorção em *batch* e evaporação e concentração de extratos

O processo de adsorção/dessorção em modo *batch*, foi executado de acordo com a metodologia descrita na **Secção 3.2** e foram seguidas as condições operatórias descritas na **Tabela 3.4**, da secção referida anteriormente. Foi utilizado em todos os ensaios o RO 164.1.

Foram realizados sete ensaios, que visaram colmatar a rutura de *stock* por parte da empresa, uma vez que o produto obtido em *batch*, segue diretamente para evaporação e consequente concentração de extratos.

No **Anexo C** constam as retas de calibração da glucose que integradas com o método do fenol sulfúrico, explicitado na **Seção 3.3.3**, serviram de base para a quantificação dos hidratos de carbono (HC). A quantificação do hidroxitirosol (HT) e tirosol (TY) foi realizada numa primeira fase recorrendo ao método *Folin-Ciocalteu* que através de correlações desenvolvidas anteriormente [17], proporciona uma análise preliminar e com resultados mais rápidos. Este método permite tirar elações sobre o andamento dos ensaios decorridos, contudo posteriormente as amostras foram analisadas também por HPLC para uma quantificação do HT e TY, mais precisa. As correlações utilizadas encontram-se disponíveis no **Anexo B**.

A representação esquemática do processo e as respetivas correntes estão ilustradas na **Figura 4.2**.

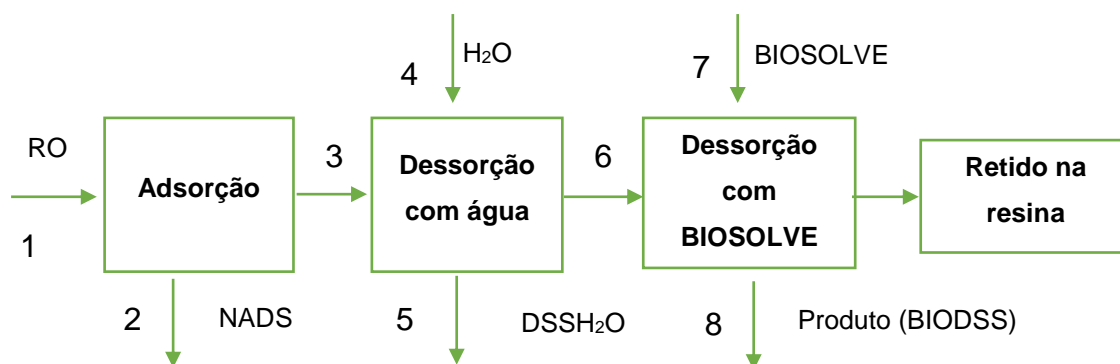


Figura 4.2 – Representação esquemática do processo de adsorção/dessorção com as respetivas correntes assinaladas.

Tabela 4.1 – Balanço mássico do ensaio 26 ao processo de adsorção/dessorção realizado em modo batch.

Corrente	1	2	3	4	5	6	7	8	Retido
Vol total (L)	1,5	1,5	-	4,5	4,5	-	4,5	4,4	-
HT (mg/L)	13000	2000	-	0	650	-	0	2000	-
HT (g)	20	3	17	0	3	14	0	9	5
TY (mg/L)	2000	150	-	0	50	-	0	300	-
TY (g)	3	0	3	0	0	3	0	1	2
HC (mg/L)	2600	1300	-	0	280	-	0	130	-
HC (g)	4	2	2	0	1	1	0	1	0

A **Tabela 4.1** acima apresentada ilustra o balanço mássico feito para o ensaio 26. Os balanços dos restantes ensaios podem ser consultados no **Anexo D**. Apesar de se ter efetuado o método de *Folin-Ciocalteu* como apoio inicial, os valores que figuram nas tabelas de balanço, são obtidos pelo método de HPLC. Os valores obtidos pelos métodos de HPLC, *Folin-Ciocalteu* e Fenol- Sulfúrico estão apresentados no **Anexo D**. No final do processo adsorção/dessorção, para o ensaio 26, obtém-se um produto com [HT] = 2000 mg/L, [TY] = 300 mg/L e [HC] = 130 mg/L.

Nas **Tabelas 4.2 e 4.3**, estão apresentados os resultados obtidos para os rendimentos para cada uma das etapas do processo, para os compostos de interesse. As percentagens nos passos de dessorção são calculadas relativamente à massa que foi adsorvida. Quanto à global, a mesma é calculada tendo em conta a massa inicial da alimentação e a massa obtida no passo final (dessorção com BIOSOLVE).

Os produtos (BIODSS) obtidos em cada ensaio foram todos acondicionados no mesmo recipiente, para posterior evaporação e consequente concentração de extratos.

Pode afirmar-se que os ensaios, realizados em modo *batch*, foram bem executados, à exceção do ensaio 24 (não foi colocado o devido volume de BIOSOLVE) visto que vão ao encontro dos resultados obtidos anteriormente pela empresa, no processo em questão.

Tabela 4.2 – Resultados obtidos, relativos ao HT, para o rendimento dos vários passos realizados pelo processo de adsorção/dessorção batch.

Ensaio	% HT Adsorvida (3h)	% HT DSSH ₂ O (3h)	% HT DSS BIOSOLVE (ON)	%Rendimento Global
23	81	22	61	49
24	86	17	25	22
25	85	18	53	46
26	85	17	52	44
27	83	17	57	48
28	83	17	51	43
29	85	16	55	47
Média	84	18	51	43

Tabela 4.3 – Média de 7 ensaios, relativos ao TY, realizados pelo processo de adsorção/dessorção batch.

Ensaio	% TY Adsorvida (3h)	% TY DSSH ₂ O (3h)	% TY DSS BIOSOLVE (ON)	%Rendimento Global
23	90	7	48	43
24	93	7	14	13
25	93	7	46	43
26	93	7	46	43
27	90	7	52	47
28	93	7	43	40
29	93	7	50	47
Média	92	7	43	49

No final do processo da adsorção/dessorção o BIODSS foi evaporado, para aumentar a concentração de HT e TY.

Posteriormente foram analisadas, pelo método de HPLC descrito na **Seção 3.3.4** amostras do RO 164.1, do produto BIODSS não evaporado e BIODSS evaporado, com a finalidade de quantificar ácidos orgânicos em concreto o ácido acético e o ácido butírico. No entanto, nesta análise apenas se pode quantificar o ácido acético, uma vez que o ácido butírico não foi detetado. O produto final (BIODSS evaporado), apresenta [CH₃COOH] = 1000 mg/L [HT] = 8000 mg/L, [TY] = 1200 mg/L e [HC] = 500 mg/L. Os resultados estão apresentados na **Figura 4.3**.

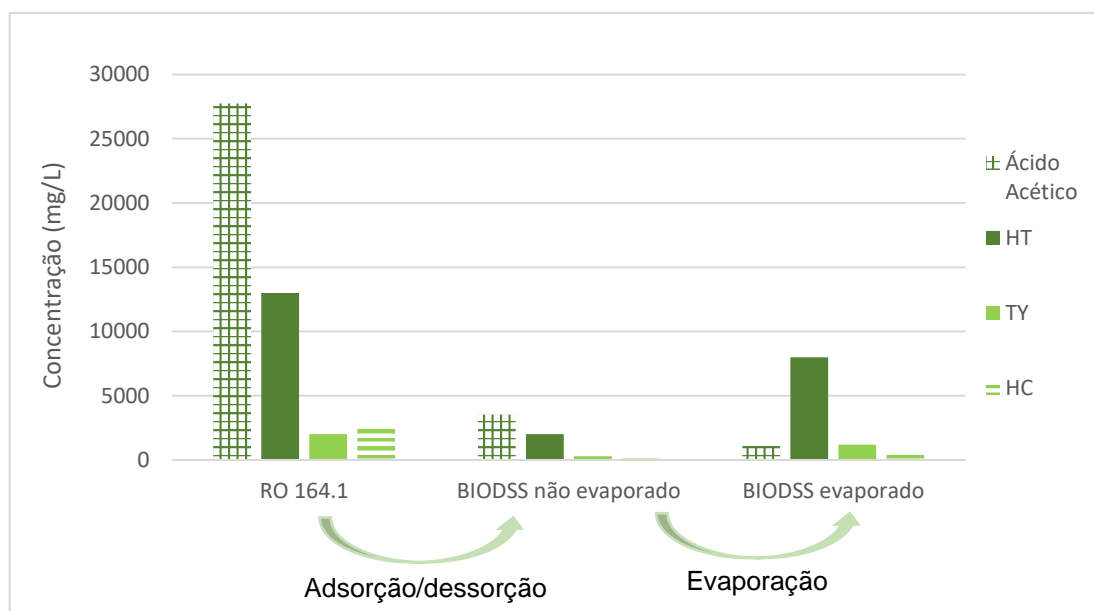


Figura 4.3 - Concentrações de ácido acético, HT, TY e HC, presentes no RO164.1, BIODSS não evaporado e BIODSS evaporado (produto final).

Esta redução do ácido acético é importante, uma vez que este composto é responsável pelo odor avinagrado no produto (BIODSS). Comparando o ácido acético presente no BIODSS não evaporado com o BIODSS evaporado (produto final) é possível ver que houve uma diminuição acentuada, 70% do acético foi eliminado.

Também foi realizada uma análise de *headspace*, aos compostos voláteis pelo método de cromatografia gasosa descrito na **Secção 3.3.1**, esta análise é qualitativa do odor do produto.

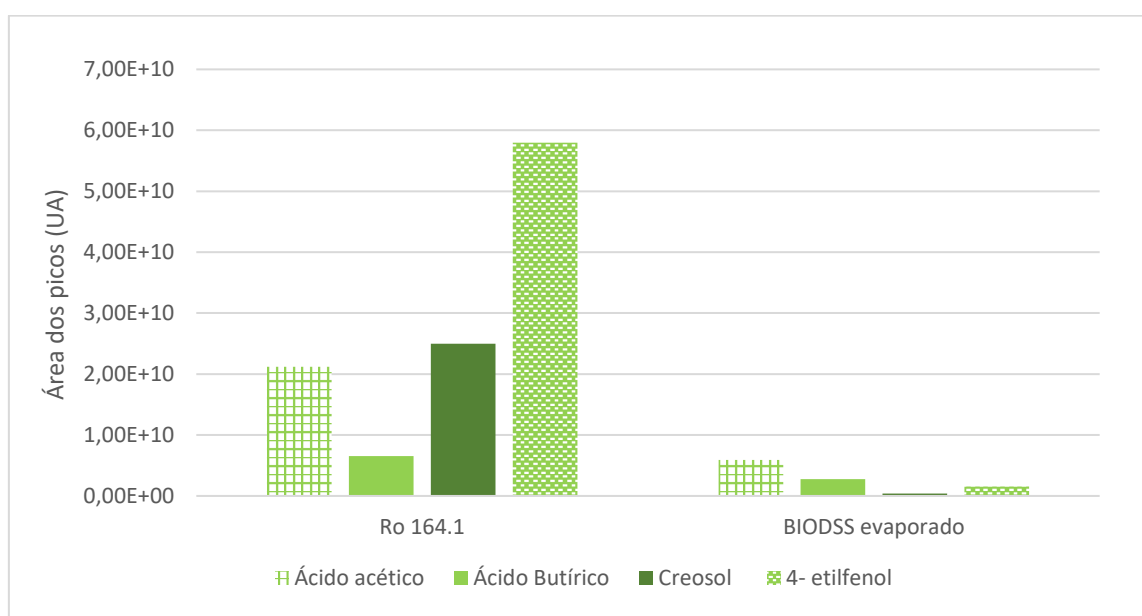


Figura 4.4 – Área dos picos de ácido acético, ácido butírico, creosol e 4-etilfenol presentes no concentrado de osmose inversa 164.1 e no BIODSS evaporado.

Na **Figura 4.4** podem ver-se as diferenças a nível qualitativo dos compostos presentes no concentrado de osmose inversa (RO 164.1) e no produto final (BIODSS evaporado), tendo-se alcançado 94%, 92% 99%, 99% de eliminação do ácido acético, ácido butírico, creosol e 4-etilfenol respetivamente.

4.3 Adsorção/dessorção em coluna

O desenvolvimento da adsorção/dessorção em coluna teve como premissa o artigo *Zagklis et al. (2015)*. [20]

O trabalho desenvolvido nesta secção constituiu o core desta tese, tendo como objetivo, já referido anteriormente, uma separação eficiente dos hidratos de carbono (HC) e hidroxitirosol (HT) e uma elevada recuperação de HT. Nesta secção irão ser apresentadas todas as etapas do estudo de desenvolvimento e otimização da coluna.

Os valores de TY são apresentados, contudo será para efeitos de documentação para estudos futuros.

O ensaio completo é composto por três fases (adsorção, dessorção com água, dessorção com mistura de solventes biocompatíveis), contudo nem sempre foram aplicadas as três, havendo variações de ensaio para ensaio.

É de salientar que os valores percentuais que irão aparecer nas tabelas, foram calculados da seguinte forma:

- adsorções – as percentagens foram calculadas tendo em conta a massa presente na alimentação e a massa não adsorvida (NADS);
- dessorções relativas aos HC – as percentagens foram calculadas relativamente à massa presente na alimentação, pois o interesse é única e exclusivamente a eliminação dos mesmos;
- dessorções relativas ao HT e TY – as percentagens foram calculadas tendo em conta a massa adsorvida, pois interessa saber a eficiência de cada passo e estudar a capacidade da resina.

O concentrado de osmose inversa (RO) utilizado primeiramente foi o 164.1. Este apresenta uma concentração de aproximadamente 13000 ppm de HT, 2000 ppm de TY e 2600 ppm de HC.

Até ser dito algo em contrário, o procedimento adotado consistiu na recolha do RO não adsorvido para um único recipiente (passo de adsorção) e na recolha de cerca de 7-9 mL para

um *vial*, a cada 10 minutos (passos de dessorção). Após terem sido determinadas as concentrações de cada amostra e assumido um volume processado a um caudal constante, a cada 10 minutos, foi possível obter a massa aproximada de cada amostra.

O ensaio 1, consistiu apenas nos dois primeiros passos do processo, adsorção (ADS) de RO durante 50 minutos e dessorção com água (DSS H₂O) durante 60 minutos. No ensaio 2 as condições mantiveram-se iguais às do ensaio 1, contudo o passo da água foi encurtado para 40 minutos.

Na **Tabela 4.4** constam percentagens em massa adsorvidas e dessorvidas em cada etapa para cada um dos compostos em estudo (HT, TY, HC).

Tabela 4.4 - Comparação das percentagens mássicas do ensaio 1 e 2 relativamente à etapa de adsorção e dessorção com água (com diferentes tempos no DSSH₂O).

Compostos	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Caudal = 2,5 mL/min		Caudal = 2,5 mL/min	
	ADS (50 min)	DSSH ₂ O (60 min)	ADS (50 min)	DSSH ₂ O (40 min)
HT	85%	56%	85%	41%
TY	≈100%	5%	≈100%	3%
HC	63%	18%	63%	16%

Os resultados obtidos mostram que o passo de adsorção é muito reproduzível, tendo se obtido valores similares para as substâncias em causa. Relativamente ao passo de dessorção com água pode observar-se que ao contrário do que acontecia no processo em *batch*, se está a perder muito HT e que a redução do tempo de dessorção não produziu melhoras significativas.

Uma vez que o objetivo do passo da dessorção com água é a remoção dos hidratos de carbono e não de HT, foi-se estudar a influência que o caudal tem na adsorção e dessorção destas substâncias.

Tabela 4.5 - Comparação das percentagens mássicas do ensaio 2 e 3 relativamente à etapa de adsorção e dessorção com água, com diferentes caudais.

Compostos	Ensaio 2 Caudal =2,5 mL/min		Ensaio 3 Caudal=5 mL/min	
	ADS (50 min)	DSSH ₂ O (40 min)	ADS (50 min)	DSSH ₂ O (40 min)
HT	85%	41%	≈100%	95%
TY	≈100%	3%	≈100%	21%
HC	85%	16%	83%	54%

Na **Tabela 4.5** verifica-se que o aumento do caudal beneficiou o passo da adsorção de HT, não tendo afetado a adsorção de HC. Em relação ao passo de dessorção, o aumento do caudal elevou significativamente a dessorção dos compostos, levando à perda de maior quantidade de HT.

O facto de se estar a dessorver muito HT no passo da água levou à realização de um ensaio sem este passo. Desta forma no ensaio 4 efetuou-se a adsorção durante 50 minutos e seguidamente um passo de dessorção de 160 minutos com BIOSOLVE 50.

Tabela 4.6 - Percentagens mássicas obtidas no ensaio 4 para a etapa de adsorção e dessorção.

Compostos	Ensaio 4 Caudal =2,5 mL/min	
	ADS (50 min)	DSS BIOSOLVE 50 (160 min)
HT	88%	≈100%
TY	73%	95%
HC	34%	50%

Uma vez que a mistura de solvente utilizada é à base de etanol era expectável que a maior parte dos HC permanecessem retidos na coluna.

É de realçar que a partir do ensaio 4 inclusive, procederam-se a alterações nas recolhas do RO não adsorvido (passo de adsorção), ou seja, começaram-se a efetuar recolhas de 10 em 10 minutos também no passo da adsorção, ao invés de todo o não adsorvido ser recolhido para um único recipiente.

Analisando os resultados da **Tabela 4.6** é possível ver que houve uma dessorção de cerca da totalidade do HT como o pretendido, contudo dessorveu-se 50% dos HC, sendo necessário reduzir esta percentagem. Com este objetivo realizou-se o ensaio 5, no qual se

diminuiu o tempo de dessorção e se aumentou a percentagem de etanol da mistura BIOSOLVE para 70%. Com este aumento pretendeu-se provocar uma menor dessorção dos HC.

Tabela 4.7 - Percentagens mássicas obtidas no ensaio 5 para a etapa de adsorção e dessorção com BIOSOLVE 70.

Compostos	Ensaio 5 Caudal =2,5 mL/min	
	ADS (50 min)	DSS BIOSOLVE 70 (40 min)
HT	90%	≈100%
TY	99%	≈100%
HC	30%	20%

Para que o ensaio 4 e 5 pudessem ser comparados, foram ajustados os dados, simulando o término de dessorção, do ensaio 4, aos 40 minutos, resultados na **Tabela 4.8**.

Tabela 4.8 - Comparação das percentagens mássicas obtidas no ensaio 4 e 5 relativamente às etapas de adsorção e dessorção com diferentes percentagens de etanol na mistura BIOSOLVE.

Compostos	Ensaio 4 Caudal =2,5 mL/min		Ensaio 5 Caudal=2,5 mL/min	
	ADS (50 min)	DSS BIOSOLVE 50 (40 min)	ADS (50 min)	DSS BIOSOLVE 70 (40 min)
HT	88%	≈ 100%	90%	≈ 100%
TY	73%	95%	99%	≈ 100%
HC	34%	50%	30%	20%

Os resultados obtidos na **Tabela 4.8** permitiram verificar que de facto houve uma diminuição da massa de HC dessorvida que se refletiu em 20% contra os 50% do ensaio 4.

O ensaio 6, foi o ensaio a partir do qual foi possível fazer uma contabilização mais cuidada e criteriosa, pois as recolhas começaram a ser efetuadas de modo diferente permitindo aferir o volume exato recolhido no decorrer dos dez minutos, alterando o *vial* de recolha de 10 em 10 minutos, permitindo uma análise mais real e mais precisa de todos os passos do processo. O ensaio 6 marca a diferença, também devido a ser o primeiro ensaio em que se realizam os três passos (adsorção do RO, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE 50). O passo da adsorção foi realizado durante 110 minutos, a dessorção com água foi de 80 minutos e a dessorção BIOSOLVE 50 foi de 60 minutos. A adsorção do RO foi longa com o intuito de garantir

que a coluna estaria saturada (com cerca de 950 mg de HT), para se poder estudar a eficiência dos passos seguintes. Facto esse que irá ser comprovado no decorrer dos seguintes ensaios.

A partir deste ensaio a abordagem irá ser ligeiramente diferente e irão também ser apresentadas as massas, pois através das mesmas consegue saber-se os rácios de HT/HC em cada etapa do processo e verificar facilmente se atingimos ou não o objetivo.

A partir deste ensaio inclusive, os ensaios passam a ser realizados com RO 163, devido ao RO 164.1 ter chegado ao fim. Este apresenta uma concentração de aproximadamente 11000 ppm de HT, 2000 ppm de TY e 2800 ppm de HC.

Tabela 4.9 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 6 relativamente às etapas de dessorção com água e BIOSOLVE 50.

Compostos	Ensaio 6 (Coluna saturada)			
	Caudal =2,5 mL/min			
	DSSH ₂ O (80 min)		DSS BIOSOLVE 50 (60 min)	
	% mássica	Massa (mg)	%mássica	Massa (mg)
HT	80%	910	23%	200
TY	43%	150	54%	190
HC	10%	70	5%	30
HT/HC (m/m)	13		7	
Massa de HT adsorvida (90 min) = 910 mg				

Como foi dito anteriormente o que é crucial avaliar são os rácios de HT/HC em cada etapa do processo. Observa-se que em ambos os passos de dessorção se obteve um rácio de 8, contudo a recuperação de HT foi muito mais elevada no passo de dessorção com água do que no de dessorção com BIOSOLVE.

Devido aos surpreendentes resultados optou-se por realizar o ensaio 7, que consistiu em manter o passo da adsorção durante 110 minutos e fazer uma dessorção com água durante 180 minutos ao invés dos 80 minutos, como no ensaio anterior. A decisão de prolongar o passo de dessorção com água, foi fomentada pelo facto de no ensaio 6, o passo de dessorção com a mistura de solventes BIOSOLVE 50 não ter assumido um papel de destaque, no que toca à sua contribuição para a separação dos HC do HT, uma vez que se obteve um rácio de 8 (igual ao da dessorção com água).

Na **Tabela 4.10** constam as duas etapas que foram comparadas.

Tabela 4.10 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 6 e 7 relativamente à etapa de dessorção com água.

Compostos	Ensaio 6		Ensaio 7	
	Caudal =2,5 mL/min		Caudal =2,5 mL/min	
	DSSH ₂ O (80 min)		DSSH ₂ O (180 min)	
	% mássica	Massa (mg)	% mássica	Massa (mg)
HT	75%	910	95%	860
TY	43%	150	65%	220
HC	10%	70	11%	70
HT/HC (m/m)	13		12	

Podemos observar pela **Tabela 4.10** que o aumento do tempo no passo de dessorção com água, não acrescentou valor ao processo uma vez que diminuámos o rácio HT/HC para 12.

Foi-se posteriormente estudar o efeito do caudal na dessorção com água. Manteve-se a adsorção durante 110 minutos a um caudal de 2,5 mL/min e alterou-se o caudal de operação para 1,5 mL/min no passo de dessorção com água que decorreu durante 140 minutos. Para os ensaios 7 e 8 serem passíveis de comparação, trataram-se os resultados de modo a que o passo de dessorção no ensaio 7 fosse apenas 140 minutos e não 180. A comparação pode ser vista na **Tabela 4.11**, abaixo indicada.

Tabela 4.11 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 7 e 8 relativamente à etapa de dessorção com água.

Compostos	Ensaio 7		Ensaio 8	
	Caudal =2,5 mL/min		Caudal =1,5 mL/min	
	DSSH ₂ O (140 min)		DSSH ₂ O (140 min)	
	% mássica	Massa (mg)	% mássica	Massa (mg)
HT	92%	830	80%	700
TY	57%	200	53%	180
HC	11%	70	10%	60
HT/HC (m/m)	12		12	

Até ao momento, contemplando os ensaios 6, 7 e 8, optou-se por trabalhar como referido anteriormente, numa zona em que se estaria claramente com a resina da coluna saturada. Devido a isso foram então realizados mais 3 ensaios em que o ponto de distinção dos 3 é unicamente o tempo de adsorção. Com isto pretendeu-se averiguar qual o tempo de adsorção ótimo.

As condições dos próximos três ensaios foram as seguintes:

- Ensaio 9 - adsorção de 90 minutos, dessorção com água 80 minutos e a dessorção com a mistura etanol/água 50:50 durante 60 minutos, caudal 2.5 mL/min;
- Ensaio 10 - adsorção de 60 minutos, dessorção com água 80 minutos e a dessorção com a mistura etanol/água 50:50 durante 60 minutos, caudal 2.5 mL/min;
- Ensaio 11 - adsorção de 40 minutos, dessorção com água 80 minutos e a dessorção com a mistura etanol/água 50:50 durante 60 minutos, caudal 2.5 mL/min.

Nas **Tabelas 4.12, 4.13, 4.14** é possível observar o que sucede nas três etapas do processo.

Tabela 4.12 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 9 relativamente às etapas de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE 50.

Compostos	Ensaio 9					
	Caudal =2,5 mL/min					
	ADS (90 min)		DSS H ₂ O (80 min)		DSS BIOSOLVE 50 (60 min)	
	% mássica	Massa (mg)	% mássica	Massa (mg)	% mássica	Massa (mg)
HT	49%	1100	76%	780	21%	220
TY	79%	300	40%	130	62%	200
HC	9%	50	13%	70	6%	30
HT/HC (m/m)	-		11		7	
Massa de HT adsorvida (90 min) = 1100 mg						

Tabela 4.13 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 10 relativamente às etapas de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE 50.

Compostos	Ensaio 10					
	Caudal =2,5 mL/min					
	ADS (60 min)		DSS H ₂ O (80 min)		DSS BIOSOLVE 50 (60 min)	
	% mássica	Massa (mg)	% mássica	Massa (mg)	% mássica	Massa (mg)
HT	77%	1160	53%	620	20%	200
TY	97%	260	27%	70	65%	170
HC	34%	130	18%	70	8%	30
HT/HC (m/m)	-		9		7	
Massa de HT adsorvida (90 min) = 1160 mg						

Tabela 4.14 - Percentagens mássicas e massas obtidas no ensaio 11 relativamente às etapas de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE 50.

Compostos	Ensaio 11					
	Caudal =2,5 mL/min					
	ADS (40 min)		DSS H ₂ O (80 min)		DSS BIOSOLVE 50 (60 min)	
	% mássica	Massa (mg)	% mássica	Massa (mg)	% mássica	Massa (mg)
HT	92%	930	70%	630	33%	300
TY	≈100%	180	16%	30	87%	160
HC	39%	100	23%	60	8%	20
HT/HC (m/m)	-		11		15	
Massa de HT adsorvida (90 min) = 930 mg						

Observa-se que à medida que o tempo de adsorção é diminuído, a percentagem adsorvida de HT aumenta enquanto que a percentagem de HC diminui. Isto acontece porque cada vez que se opera numa zona menos saturada da resina, diminui-se o desperdício de HT e os HC como demoram mais tempo a ser adsorvidos, não têm tempo suficiente para serem adsorvidos. No ensaio 11 verifica-se que 92% do HT que passou na coluna foi adsorvido contra os 49% do ensaio 9. Contudo esta análise seria muito superficial se não se tiverem em conta as massas. As massas refletem a quantidade efetivamente retida na coluna no decorrer da

adsorção, observa-se uma massa de HT adsorvida de 1100 mg (ensaio 9) comparativamente com os 930 mg de HT (ensaio 11). Esta diferença irrisória só vem corroborar o mencionado anteriormente, e de facto se com 90 minutos de adsorção a coluna já se encontra saturada o mesmo sucede para os ensaios anteriores com 110 minutos de adsorção.

Contrapondo nos três ensaios o passo de dessorção com água e o passo de dessorção com BIOSOLVE 50, verifica-se uma diferença de dessorção de HT muito superior no passo da água do que no passo com BIOSOLVE. No entanto, seria previsto o contrário, tendo em conta o artigo *Zagklis et al. (2015)* [20] o HT seria maioritariamente dessorvido no último passo. A antítese de resultados pode ter como explicação, o facto de usarem uma matéria prima muito mais rica em HC e com quantidades muito inferiores de HT.

Uma outra análise crucial a fazer diz respeito ao rácio HT/HC. Em todos os ensaios o rácio HT/HC presente na alimentação (RO) é de 4. Através dos ensaios realizados observa-se uma consistência indicativa que no passo de dessorção com água o rácio é superior ao do passo seguinte (dessorção com BIOSOLVE). Isto permite aferir que a eficiência de separação é superior onde logicamente o rácio é maior, invalidando a necessidade de prosseguir com a última etapa.

É de salientar que passar de uma matéria prima que continha 4 vezes mais HT que HC, para um produto que contém 10 vezes mais HT do que HC é extremamente positivo, na medida em que um rácio HT/HC= 10 constitui o mínimo aceitável para se considerar o HT útil. Isto é, tendo em conta a aplicação futura do produto BIODSS (que contém 10 vezes mais HT que HC), este rácio é o mínimo com que se poderá trabalhar de modo a não comprometer a qualidade final do produto para o qual está destinado.

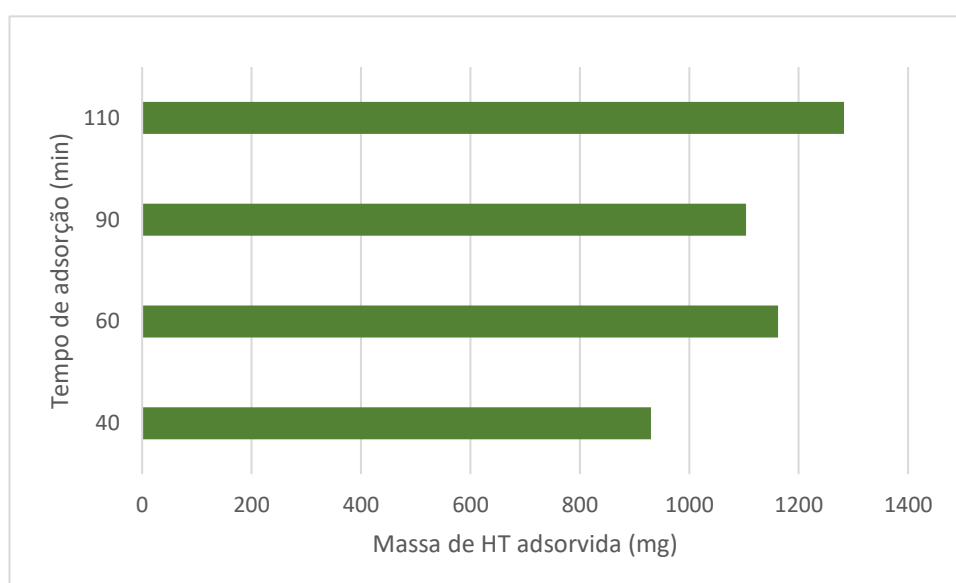


Figura 4.5 - Massa de HT adsorvida para tempos de adsorção de 40, 60, 90 e 110 minutos.

Pode notar-se na **Figura 4.5** que a oscilação de massa de HT adsorvida, para diferentes tempos de adsorções, é praticamente inexistente, tendo em conta que o método de HPLC (através do qual se obtém as concentrações) tem erros associados, à semelhança do que acontece em qualquer outro método. A análise mais importante da **Figura 4.5** prende -se com dispensabilidade de operar com tempos de adsorção tão longos, uma vez que o tempo gasto não contribui para uma melhoria substancial que se reflita na massa de HT adsorvida.

Irá ser apresentado de seguida, uma análise complementar gráfica do ensaio 6 ao 11 que permite visualizar melhor o comportamento do HT nas diferentes etapas do processo ao longo do tempo. Os volumes, concentrações, massas e rácios de todos os ensaios realizados, que auxiliaram e permitiram tanto os balanços mássicos percentuais nas tabelas como a análise gráfica, encontram-se disponíveis no **Anexo E**.

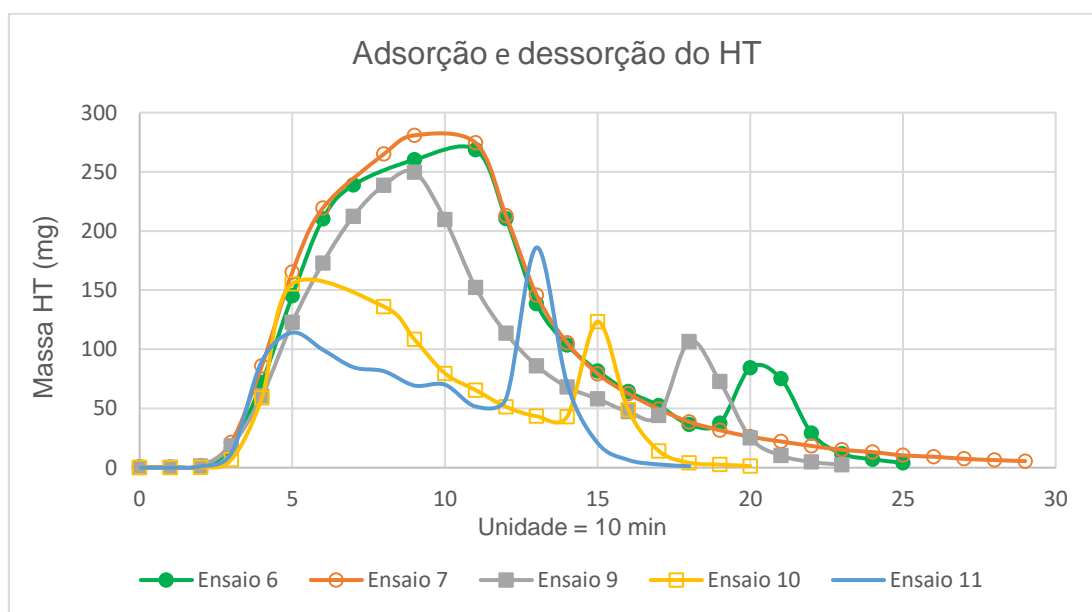


Figura 4.6 - Resultados obtidos para os processos de adsorção/dessorção do ensaio 6, 7, 9, 10 e 11.

A **Figura 4.6**, contempla os passos de adsorção e dessorção com água para os ensaios 7, uma vez que neste não foi realizado o passo de dessorção com BIOSOLVE 50, para os ensaios 6, 9, 10 e 11 têm-se a representação do processo na sua totalidade. O ensaio 8 não é representado pois o tipo de recolha no passo da adsorção, foi diferente não permitindo este tipo de análise detalhada. No eixo das ordenadas temos a massa de HT ao longo do tempo e considerou-se a escala de 1 unidade equivalente a dez minutos, por uma questão prática associada à escala do gráfico. Ressalva-se que o tempo 0 minutos corresponde a 10 minutos,

isto porque se considera que 10 minutos é o tempo que a água que se encontra na coluna resultante da prévia lavagem da resina antes de cada ensaio, demora a sair.

Pode observar-se uma sólida consistência entre os vários ensaios e verificar que existe repetibilidade, visto que nos tempos coincidentes dos diferentes ensaios, no que diz respeito ao passo de adsorção as linhas do gráfico se encontram sobrepostas, acentuando deste modo a uniformidade existente. No início do ensaio a resina está limpa conseguindo adsorver a totalidade de HT, presente no volume que está a ser tratado. À medida que o ensaio decorre a resina começa a ficar saturada, ou seja, começa a adsorver cada vez menos e consequentemente pode observar-se uma quantidade de massa não adsorvida maior. Nos ensaios 6, 9, 10 e 11 destaca-se uma curva abrupta, que marca o passo de dessorção com BIOSOLVE. No início deste passo observa-se um pico de dessorção, isto significa que o etanol vai ajudar na remoção do HT remanescente, contudo não é só o HT que ele vai remover, vai também impulsionar a dessorção de HC, resultando num menor rácio HT/HC. Nas **Tabelas 4.12, 4.13 e 4.14** apresentadas anteriormente podemos confirmar este facto, uma vez que o rácio HT/HC é menor no passo de dessorção com BIOSOLVE do que no passo de dessorção com água.

Nas **Figuras 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11** estão representados os perfis em massa das curvas de adsorção/dessorção obtidas por meio da contabilização do volume processado a cada 10 minutos de ensaio e da concentração.

Reiterando que o rácio de HT/HC do RO da alimentação é 4, multiplicou-se por 4 a massa de HC recolhida ao longo de cada um dos ensaios. O objetivo da multiplicação pelo fator 4 é permitir uma análise gráfica visual mais clara, sem recorrer a necessidade de ter duas escalas diferentes.

Através da observação das figuras abaixo apresentadas, é possível identificar facilmente a característica comum em todos os ensaios. O declive inicial extremamente acentuado, da linha verde clara que diz respeito aos HC, esta demonstra logo desde início que os HC estão a ser menos adsorvidos comparativamente ao HT. Por outro lado, o facto de a linha do HT permanecer paralela e coincidente com o eixo das abcissas, prova a eficaz adsorção do HT em detrimento dos HC, uma vez que se pode constatar que são pouco adsorvidos.

Por último, pode observar-se nos ensaios em que é realizado o passo da dessorção com BIOSOLVE (ensaio 6, 9, 10 e 11), para além de se dessorver o remanescente HT que ainda está retido na coluna, também é dessorvido HC, contudo pode-se verificar que no final de cada um dos ensaios as linhas do HT e HC ficam com uma distância muito ténue, chegando em alguns casos a uma sobreposição. Contudo a sobreposição, não chega a acontecer, pois os gráficos apresentam 4 vezes mais que a massa de HC real.

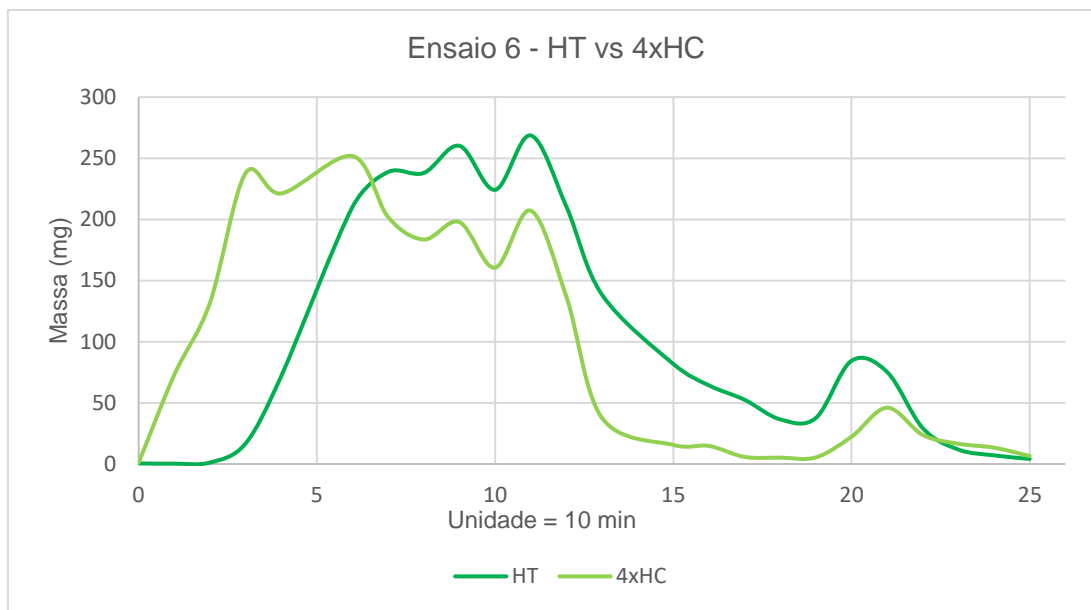


Figura 4.7 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 6.

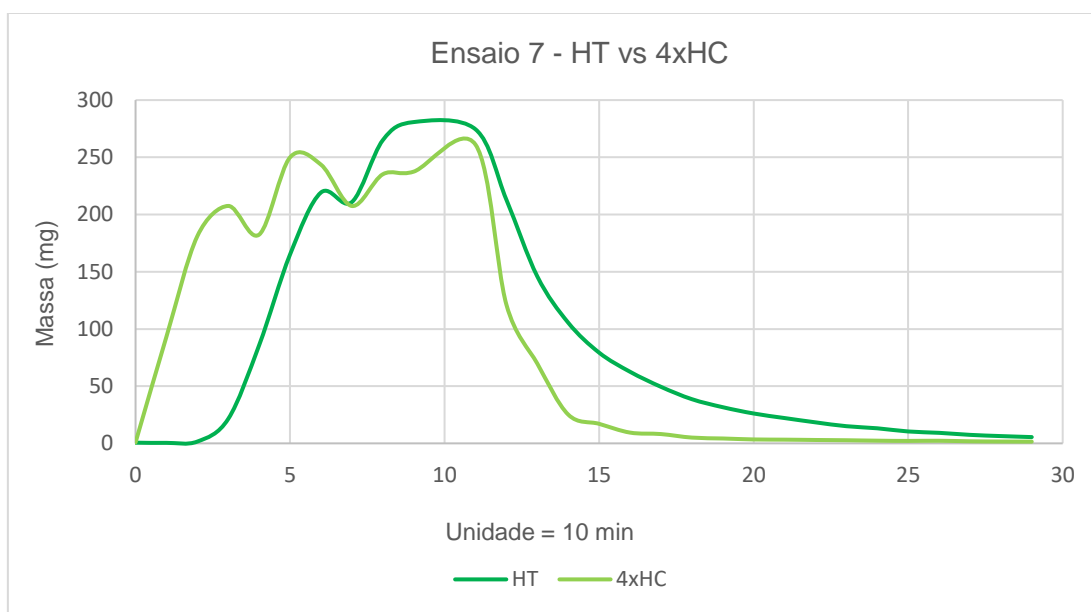


Figura 4.8 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 7.

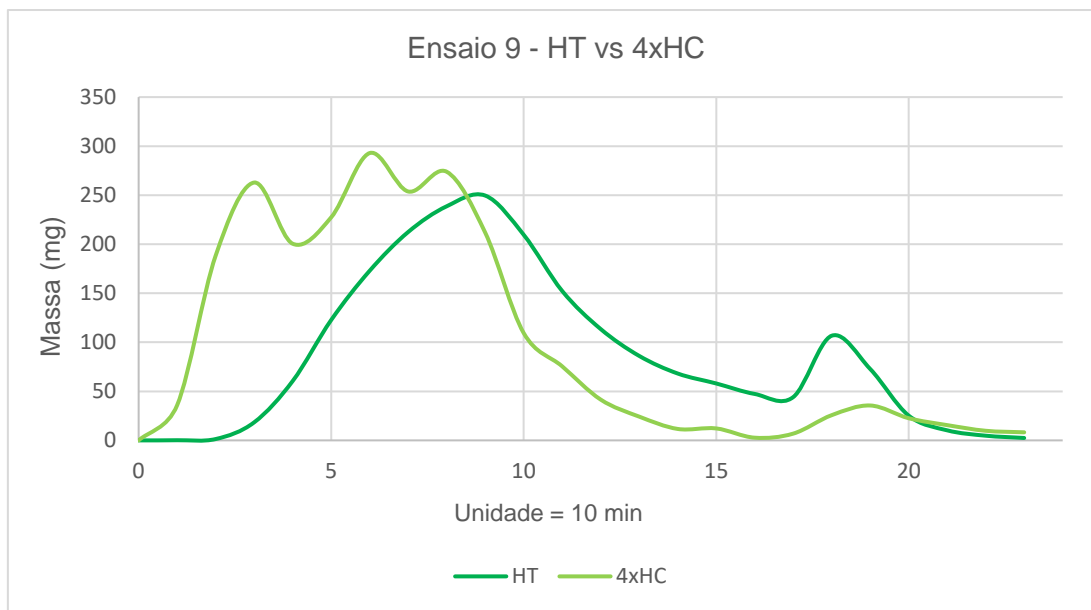


Figura 4.9 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 9.

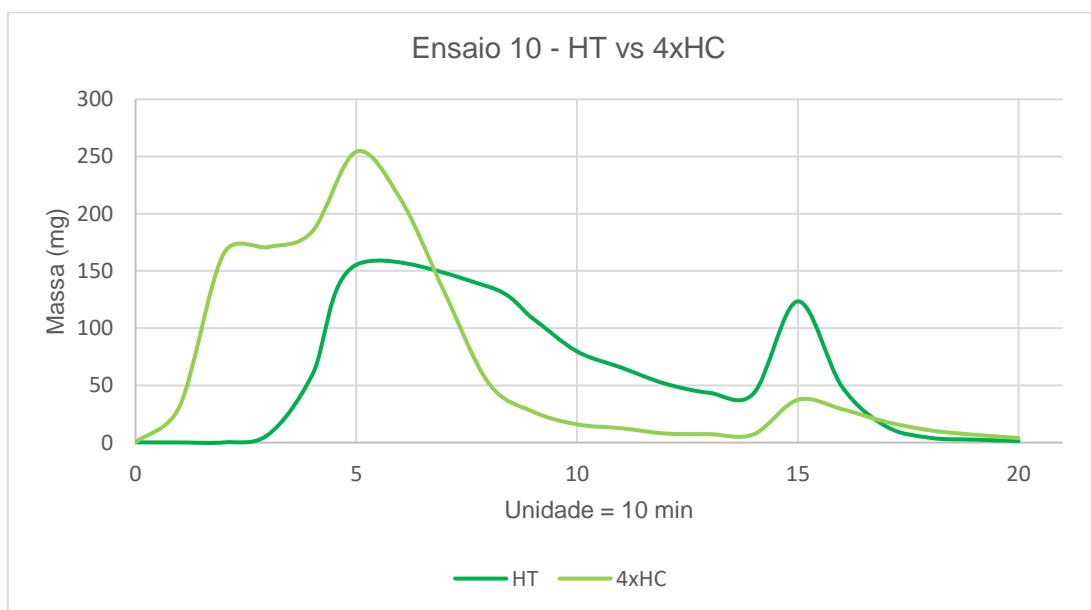


Figura 4.10 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 10.

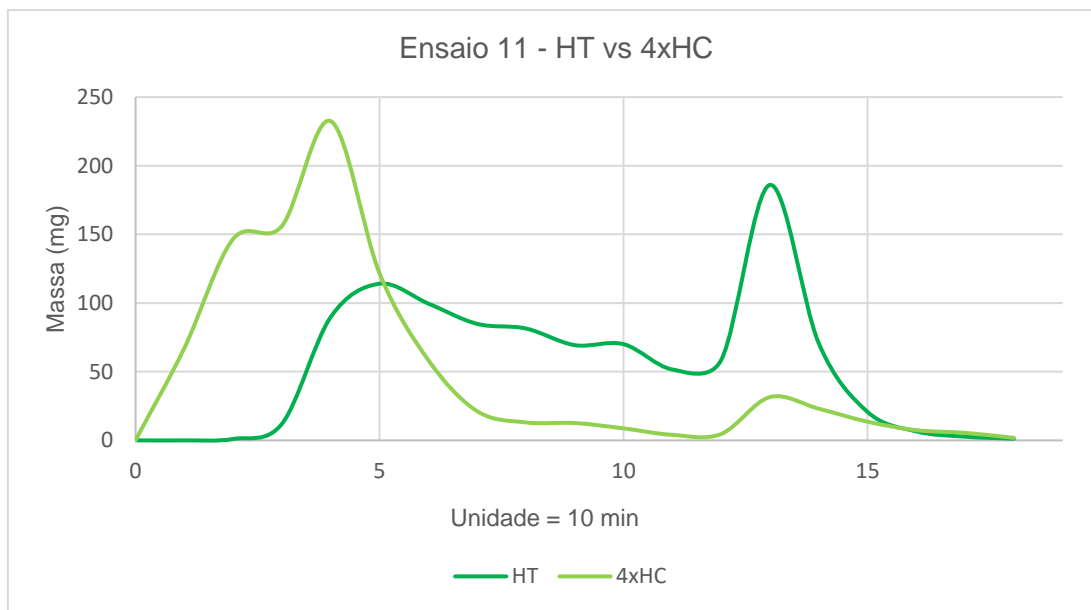


Figura 4.11 - Massa de HT e 4 vezes a massa real de HC, ao longo do processo de adsorção/dessorção do ensaio 11.

Após se terem analisado os resultados dos 6 últimos ensaios, foi possível tirar elações sobre como proceder nos ensaios futuros e qual o modo mais vantajoso para tirar o máximo partido das etapas envolvidas no processo. Para tal, com base nas massas e nos rácios fez-se uma análise paralela na qual se conclui que rácios se podem obter e qual a melhor maneira de otimizar o desperdício de HT conjugando tempos de dessorções.

4.3.1. Análise dos compostos voláteis

Depois de terem sido realizados os últimos ensaios de adsorção/dessorção em coluna, recorreu-se à cromatografia gasosa, descrita na **Secção 3.3.1**, para avaliar de forma qualitativa os compostos voláteis presentes em cada etapa do processo. Na **Tabela 4.15**, estão representadas as percentagens de eliminação dos compostos em estudo, na etapa de dessorção com água (DSSH₂O) e dessorção com uma mistura de solventes com 50% de etanol (DSS BIOSOLVE 50). Estas percentagens foram calculadas relativamente à alimentação (RO), através dos valores das áreas dos picos de cada um dos compostos voláteis.

Tabela 4.15 - Percentagens de eliminação do ácido acético, ácido butírico, creosol e 4-etilfenol, na dessorção com água e na dessorção com BIOSOLVE 50.

	Ensaio 6	
	% eliminação DSSH ₂ O	% eliminação DSS BIOSOLVE 50
Ácido acético	86%	*
Ácido butírico	≈0%	84%
Creosol	≈100%	99%
4- etilfenol	99%	99%
	Ensaio 9	
	% eliminação DSSH ₂ O	% eliminação DSS BIOSOLVE 50
Ácido acético	87%	≈100%
Ácido butírico	≈0%	80%
Creosol	99%	99%
4- etilfenol	99%	99%
	Ensaio 10	
	% eliminação DSSH ₂ O	% eliminação DSS BIOSOLVE 50
Ácido acético	83%	*
Ácido butírico	0%	90%
Creosol	≈100%	99%
4- etilfenol	99%	99%
	Ensaio 11	
	% eliminação DSSH ₂ O	% eliminação DSS BIOSOLVE 50
Ácido acético	85%	*
Ácido butírico	≈0%	81%
Creosol	99%	99%
4- etilfenol	99%	≈100%

*Não foi possível detetar este composto

Pela **Tabela 4.15** é possível verificar que tanto o creosol como o 4-etilfenol foram eliminados com sucesso. Isto significa que ambos ficaram retidos na resina, não tendo sido dessorvidos. No entanto, conseguiu-se identificar a presença de ácido butírico e acético, porém não sendo uma análise quantitativa, não podemos afirmar qual a quantidade destas duas substâncias.

Através do método de HPLC, descrito na **Secção 3.3.4**, foi possível saber a quantidade destes dois compostos, nas diferentes etapas. A **Figura 4.12** contempla os ensaios 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

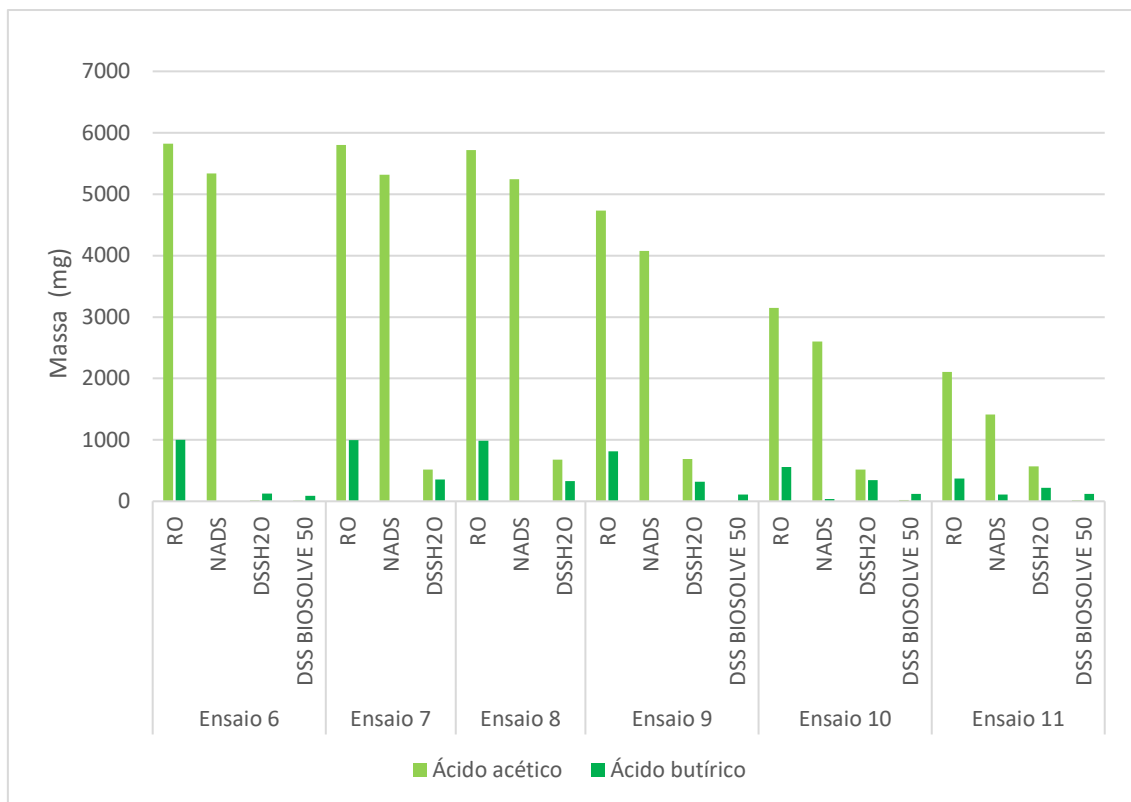


Figura 4.12 - Massa em mg de ácido acético e ácido butírico presentes nas etapas de adsorção/dessorção em coluna dos ensaios 6, 7, 8, 9, 10 e 11.

As quantidades de ácido acético e butírico variam no RO de ensaio para ensaio, pois foi processado um volume diferente. É transversal em todos eles, que grande parte do ácido acético não chega a ser adsorvido, visto que ele aparece sempre em elevada quantidade no efluente não adsorvido (NADS). Relativamente ao ácido butírico verifica-se precisamente o contrário, dado que ele não aparece no NADS. Porém o crucial é verificar se houve uma taxa de eliminação total ou elevada destes compostos, ou seja, quantificar a massa de cada ácido que estava presente na alimentação (RO) e observar no final do processo que massa permanece no produto final. Nos ensaios em que se realiza o passo de dessorção com BIOSOLVE 50, observa-se uma eliminação total do ácido acético e apenas uma pequena quantidade do ácido butírico.

É de ressaltar que as condições operatórias que irão ser postas em prática futuramente pela empresa, são as do ensaio 11 através do qual se concluiu que não seria necessário o passo de dessorção com BIOSOLVE 50, posto isto o produto final passa a ser proveniente do passo de dessorção com água. No ensaio 11, as percentagens de eliminação no produto dessorvido com água, relativamente ao acético e butírico são de 73% e 41%, respetivamente.

4.4 Simulação do processo *batch* em coluna

O processo de adsorção/dessorção em coluna com recirculo. Foi pela primeira vez iniciado no âmbito desta tese. Este tinha como objetivo a separação de hidratos de carbono do hidroxitirosol e tentou-se recriar e aproximar as condições do *batch*, contudo operado em coluna. Para tal, realizaram-se várias experiências, sendo que a primeira fase do estudo foi testar apenas o passo de adsorção. A alimentação foi de 90 mL em todos os ensaios e para todos os passos (adsorção, dessorção com água e dessorção com uma mistura equitativa de etanol/água).

Foi também estudada a possibilidade de se poder utilizar a correlação que existe, operada em modo *batch* entre o método *Folin-Ciocalteu* e a quantificação de hidroxitirosol (HT) e tirosol (TY), contudo as semelhanças dos resultados obtidos pelo método em causa não são consistentes para se poder aplicar o método como análise preliminar.

Ressalva-se que, à semelhança do que foi referido na adsorção/dessorção em modo semi-contínuo, apesar de serem apresentadas as percentagens de adsorção do tirosol (TY), este não constitui um foco de estudo nesta tese, apenas consta nas figuras que irão ser apresentadas para efeitos de documentação, para posteriormente poder ser também estudado já com uma base prévia.

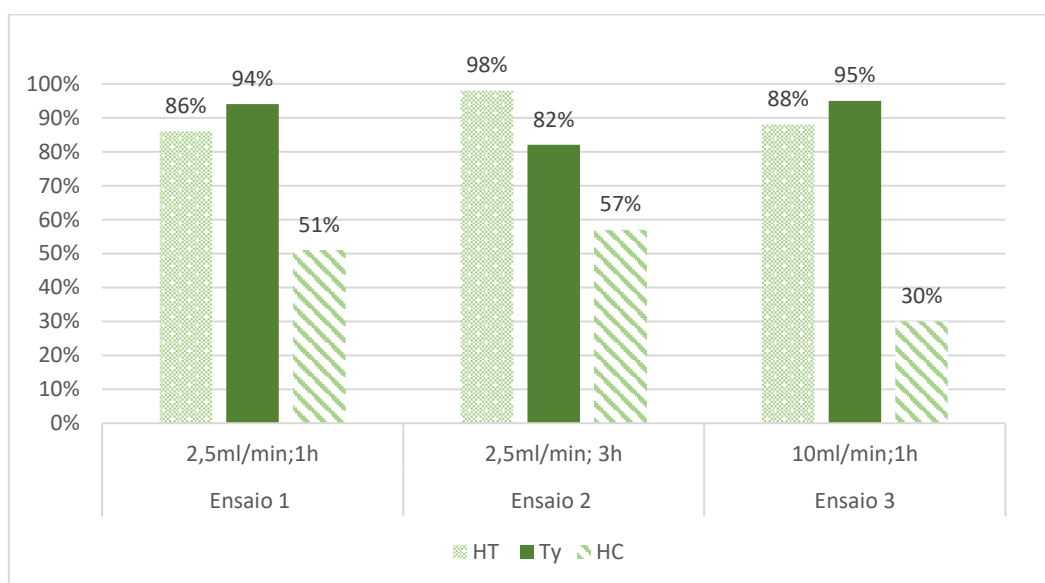


Figura 4.13 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo adsorvidas, adsorção em coluna com recirculo, do ensaio 1, 2 e 3.

Na **Figura 4.13**, pode observar-se os resultados de três condições diferentes, no passo da adsorção. O ensaio 2 difere do primeiro apenas no tempo de operação enquanto no ensaio 3 optou-se por alterar o caudal, mantendo o mesmo tempo do ensaio 1. As diferenças mais significativas ocorrem ao nível dos HC (ensaio 1 e 3). No entanto, no ensaio 1 não se chega praticamente a tirar partido do recirculo, uma vez que alimentação (RO) apenas é recirculada 2 vezes operando 1h (volume de recolhido 60 mL, caudal 2,5 mL/min). No ensaio 2 e 3 a alimentação é recirculada cerca de 6 vezes em cada, sendo o reciclo proporcionado no ensaio 2 pelo fator tempo e no ensaio 3 pelo caudal. No entanto as adsorções nos três ensaios apresentam poucas diferenças.

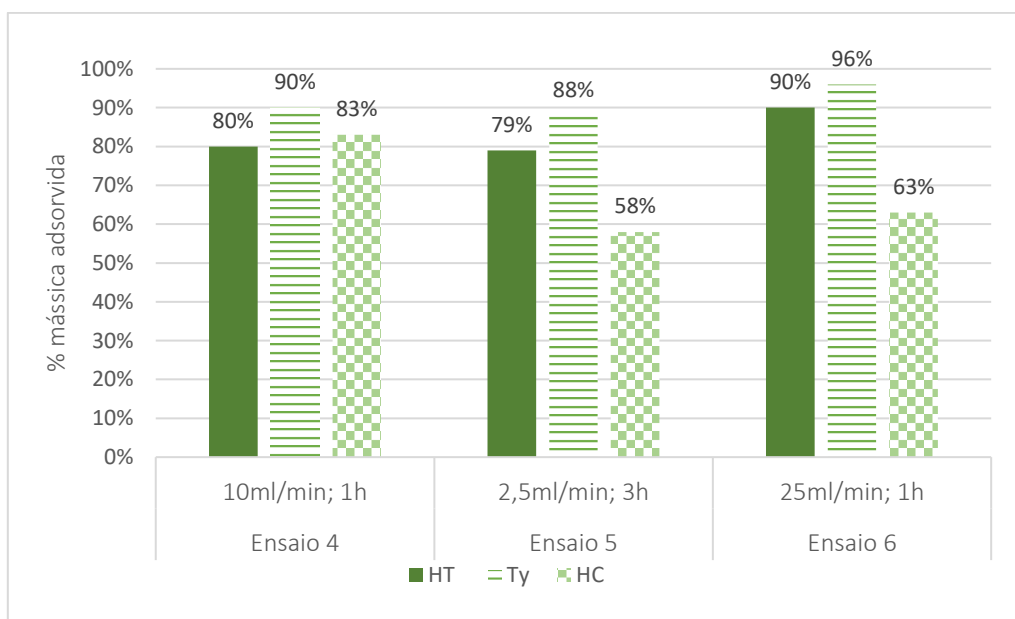


Figura 4.14 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo na etapa de adsorção em coluna com recirculo, do ensaio 4, 5 e 6.

Em consequência do término do RO 164.1, começou-se a operar com o RO163. Devido a isso foram replicadas as condições operatórias dos ensaios anteriores, à exceção do primeiro ensaio, uma vez que não se tirava partido do reciclo. É possível então observar que o ensaio 4 e 5 apresentam as mesmas condições do ensaio 3 e 2 respetivamente. As diferenças não são significativas apesar dos RO serem ligeiramente diferentes. No ensaio 6 foi experimentado um caudal bastante superior obtendo-se um reciclo da alimentação aproximadamente de 24 vezes.

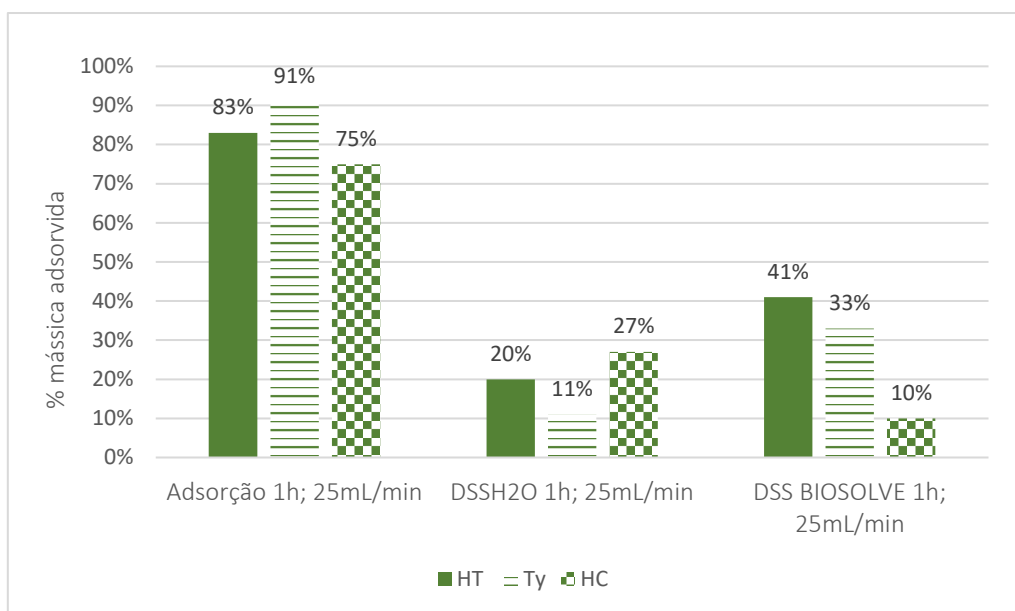


Figura 4.15 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo na etapa de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE, em coluna com recirculo, do ensaio 7.

Na **Figura 4.15**, pode observar-se o ensaio 7. Este foi o primeiro ensaio em que se executaram as 3 etapas, no entanto os resultados não correspondem aos parâmetros requeridos para ser considerado um ensaio de sucesso. Tanto na dessorção com água como na dessorção com a mistura de solventes biocompatíveis (BIOSOLVE 50), os resultados de dessorção de HT são reduzidos e apresentam uma discrepância diminuta comparativamente ao que é dessorvido de HC, não sendo obtida a separação desejada.

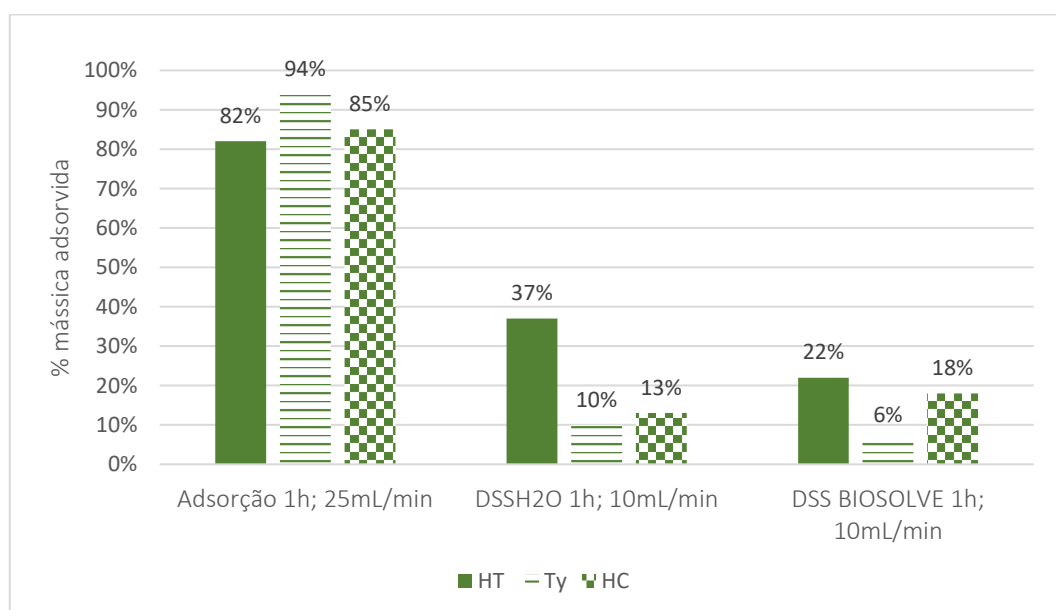


Figura 4.16 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo na etapa de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE, em coluna com recirculo, do ensaio 8.

A **Figura 4.16** correspondente ao ensaio 8, pretendeu-se estudar a influência do caudal em ambas as etapas de dessorção. Comparando este ensaio com as etapas de dessorção do ensaio 7 é possível constatar que se alcançou uma remoção maior de HT utilizando um caudal mais baixo (10 mL/min), contudo o aumento não foi significativo. Como tal, no ensaio 9 procedeu-se ao estudo da relação do fator tempo nas etapas de dessorção

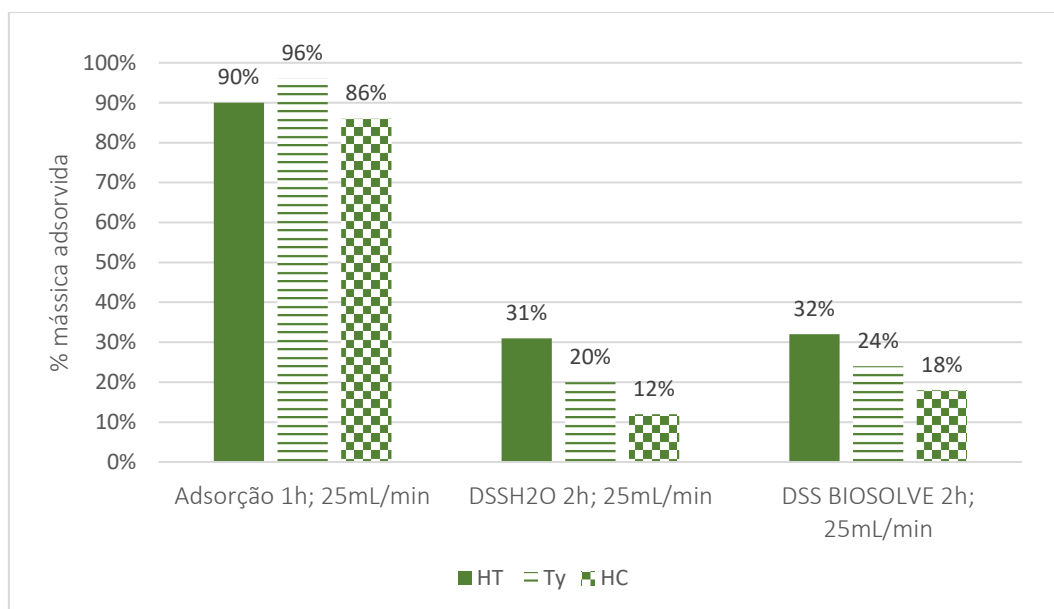


Figura 4.17 - Percentagens mássicas das substâncias em estudo na etapa de adsorção, dessorção com água e dessorção com BIOSOLVE, em coluna com recirculo, do ensaio 9.

Pode observar-se que o ensaio da **Figura 4.17** comparado com o ensaio 7, o aumento do tempo de dessorção no passo da água originou uma ligeira melhoria relativamente ao HT dessorvido, passando de 20% para 31%. Também se verificou uma diminuição de HC dessorvidos.

Os ensaios realizados em coluna com recirculo não foram bem sucedidos, pois apesar de se terem conseguido alcançar boas adsorções, as dessorções do composto de interesse (HT) foram muito baixas, bem como a separação de HT e HC.

5 Conclusão

Pode afirmar-se com assertividade que o objetivo principal foi cumprido com sucesso. Conseguiu-se um desenvolvimento de um processo de adsorção/dessorção em coluna, promissor e com rendimentos mais elevados do que vigora atualmente. Vão ser realizados alguns testes para posteriormente se avançar com o *scale-up* e implementação do processo.

Nos ensaios finais de adsorção em coluna, foi atingida uma separação eficiente entre os hidratos de carbono e o hidroxitirosol, uma vez que foi obtido um rácio igual ou superior a 10 entre hidroxitirosol (HT) e hidratos de carbono (HC), mais concretamente no último ensaio foi possível atingir um rácio de 11, com um rendimento de recuperação de hidroxitirosol de 86%.

Através do processo desenvolvido em coluna foi possível atingir uma eliminação total dos compostos voláteis creosol e 4-etilfenol, e uma eliminação de ácido acético e butírico de 73% e 41%, respetivamente.

Uma das principais conclusões desde trabalho é que é possível obter elevados rendimentos, operando com tempos curtos na adsorção (40 min), uma vez que a resina satura rapidamente em HT, e tempos de dessorção com água (80 minutos).

Contrariamente ao que foi escrito no artigo *Zagklis et al.*(2015) [20] não existe a necessidade de se executar um passo de dessorção com uma mistura de etanol e água, para retirar o hidroxitirosol, uma vez que este, no caso estudado, é maioritariamente removido no passo de dessorção com água. Assim sendo, o processo desenvolvido fica resumido a duas etapas ao invés de três. O que se traduz em menores gastos para a empresa na medida em que dispensam a necessidade de utilização de etanol, bem como ao ser retirada uma etapa do processo se consegue reduzir o tempo de operação em 40%.

Conclui-se também, que a resina com a qual se opera é uma mais valia para o processo em causa, uma vez que, para as concentrações estudadas, privilegia a adsorção de compostos fenólicos em detrimento dos hidratos de carbono.

Por último, este trabalho possibilitou retirar elações relevantes que são úteis e podem ser extensíveis ao processo atualmente usado pela empresa (adsorção em *batch*), na medida em que estão a decorrer testes para verificar se as mesmas condições adaptadas resultam, reduzindo em larga escala o tempo de operação e os custos com solventes envolvidos na última etapa (dessorção com BIOSOLVE 50).

6 Limitações e perspectivas de trabalho futuro

As principais limitações deste trabalho prenderam-se principalmente com o tempo inerente à análise de resultados, que acabou por influenciar o tempo entre a realização de cada ensaio e com a bomba utilizada nos ensaios em coluna, devido à dificuldade de estabilização de caudais.

É fundamental manter a geometria da coluna de adsorção no *scale-up*, ou seja, manter a razão entre a altura e o diâmetro, ter em atenção o facto aquando o *scale-up* for realizado que a altura do leito fixo irá naturalmente aumentar e consequentemente o tempo de contato da resina com o adsorvato também.

Utilizar uma bomba com 3 canais disponíveis, um com a alimentação (RO), outro destinado à etapa de dessorção com água, um com o primeiro solvente (etanol) utilizado para a lavagem da resina no final da corrida.

Fazer a montagem com a coluna a ser alimentada pelo topo para que seja mais fácil a descarga do volume morto, entre as etapas do processo, seja feita por gravidade.

Uma vez que é utilizado etanol para a regeneração da coluna, pode ser considerada a opção de destilação do mesmo para a sua posterior reutilização.

7 Bibliografia

- [1] D. Kalderis and E. Diamadopoulos, "Valorization of Solid Waste Residues from Olive Oil Mills: A Review," *Terr. Aquat. Environ. Toxicol.*, vol. 4, no. Special Issue 1, pp. 7–20, 2010.
- [2] [Online]. Available: <http://www.agrotec.pt/noticias/alqueva-transformou-portugal-no-4-exportador-mundial-de-azeite/>. [Accessed: 25-Feb-2019].
- [3] *World Olive Oil Exhib.*, 2017.
- [4] [Online]. Available: <https://www.radiocampanario.com/ultimas/regional/alqueva-transformou-portugal-importador-de-azeite-no-4-exportador-mundial>. [Accessed: 21-Feb-2019].
- [5] [Online]. Available: <https://scientificusblogpt.wordpress.com/2015/06/25/oliveira-azeite-e-aguas-residuais-parte-iv/>. [Accessed: 26-Feb-2019].
- [6] S. Souilem, A. El-Abbassi, H. Kiai, A. Hafidi, S. Sayadi, and C. M. Galanakis, *Olive oil production sector: Environmental effects and sustainability challenges*. Elsevier Inc., 2017.
- [7] A. Mekki, A. Dhouib, and S. Sayadi, "Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater," *Microbiol. Res.*, vol. 161, no. 2, pp. 93–101, 2006.
- [8] I. Karaouzas, N. T. Skoulikidis, U. Giannakou, and T. A. Albanis, "Spatial and temporal effects of olive mill wastewaters to stream macroinvertebrates and aquatic ecosystems status," *Water Res.*, vol. 45, no. 19, pp. 6334–6346, 2011.
- [9] A. Pavlidou *et al.*, "Effects of olive oil wastes on river basins and an oligotrophic coastal marine ecosystem: A case study in Greece," *Sci. Total Environ.*, vol. 497–498, pp. 38–49, 2014.
- [10] M. Servili and G. F. Montedoro, "Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 104, no. 9–10, pp. 602–613, 2002.
- [11] R. Bernini, E. Mincione, M. Barontini, and F. Crisante, "Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 19, pp. 8897–8904, 2008.
- [12] K. L. Tuck, P. J. Hayball, and I. Stupans, "Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 8, pp. 2404–2409, 2002.
- [13] S. Charoenprasert and A. Mitchell, "Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 29, pp. 7081–7095, 2012.

- [14] “Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), mainte,” *EFSA J.*, vol. 9, no. 4, p. 2033, 2016.
- [15] J. G., scar Lpez, M. ngeles, and A. Marset, “Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives,” *Olive Oil - Const. Qual. Heal. Prop. Bioconversions*, no. December 2015, 2012.
- [16] M. N. Da Ponte, J. L. Dos Santos, A. A. Matias, A. V. Nunes, C. M. Duarte, and J. P. Crespo, “US 8066881 B2,” vol. 2, no. 12, 2011.
- [17] Marques, Marta Alexandra Dias. Processo de adsorção/dessorção para a purificação de um extracto natural rico em hidroxitirosol: Optimização do processo batch. Almada, Setúbal, Portugal : s.n., 20 de Setembro de 2017.
- [18] Romeu, Maria. Desenvolvimento de alimentos funcionais enriquecidos com polifenóis de azeitona. 2016.
- [19] K. B. Petrotos, P. E. Gkoutisidis, M. I. Kokkora, K. G. Giankidou, and A. G. Tsagkarelis, “A study on the kinetics of olive mill wastewater (OMWW) polyphenols adsorption on the commercial XAD4 macroporous resin,” *Desalin. Water Treat.*, vol. 51, no. 10–12, pp. 2021–2029, 2013.
- [20] D. P. Zagklis, A. I. Vavouraki, M. E. Kornaros, and C. A. Paraskeva, “Purification of olive mill wastewater phenols through membrane filtration and resin adsorption/desorption,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 285, pp. 69–76, 2015.
- [21] M. L. Soto, A. Moure, H. Domínguez, and J. C. Parajó, “Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review,” *J. Food Eng.*, vol. 105, no. 1, pp. 1–27, 2011.
- [22] [Online]. Available: <https://www.majordifferences.com/2013/02/difference-between-physical-adsorption.html#.XHPiTOj7RPZ>. [Accessed: 25-Feb-2019].
- [23] D. Cooney, *Adsorption Design for Wasterwater Treatment*. Boca Raton, Fl. : Lewis Publishers, 1999.
- [24] D. D. Do, *Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics*, vol. 2, no. Imperial College Press. 1998.
- [25] P. Description *et al.*, “AMBERLITE XAD POLYMERIC RESINS Replacement for Product Code 21 , 648-8,” pp. 16–18, 1991.
- [26] Rohm and Haas, “Amberlite XAD7 Industrial Grade Polymeric Adsorbent,” no. 177, pp. 2–5, 2003.
- [27] Henriques, Maria Inês. Desenvolvimento de novos produtos cosméticos enriquecidos com hidroxitirosol. Almada, Setúbal, Portugal : s.n., 20 de Setembro de 2018.

- [28] Waterhouse AL, "Determination of Total Phenolics," *CCurrent Protoc. Food Anal. Chem.*, vol. 11, no. 1, pp. 130–143, 2002.
- [29] J. S. Pires, P. B. Torres, D. Y. A. C. Santos, and F. Chow, "Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas," *Inst. Biociências, Univ. São Paulo*, pp. 1–5, 2017.
- [30] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. P. De Mello, "Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L.," *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6852–6865, 2013.
- [31] R. M. Lamuela-Raventós, "Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity," *Meas. Antioxid. Act. Capacit. Recent Trends Appl.*, pp. 107–115, 2017.
- [32] T. Masuko, A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S. I. Nishimura, and Y. C. Lee, "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format," *Anal. Biochem.*, vol. 339, no. 1, pp. 69–72, 2005.
- [33] P. Miralles, A. Chisvert, and A. Salvador, "Determination of hydroxytyrosol and tyrosol by liquid chromatography for the quality control of cosmetic products based on olive extracts," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 102, pp. 157–161, 2014.
- [34] A. Hplc and T. A. Hpx-, "Bulletin_6333," pp. 7–10.

8 Anexos

A. Cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 8.1 - Área dos picos correspondentes a concentrações do padrão de hidroxitirosol.

Concentração de Hidroxitirosol (mg/L)	Área dos picos (UA)
0	0
10	39,76
25	99,66
50	199,19
100	401,16
200	791,98
300	1217,26
400	1602,29
500	2002,92

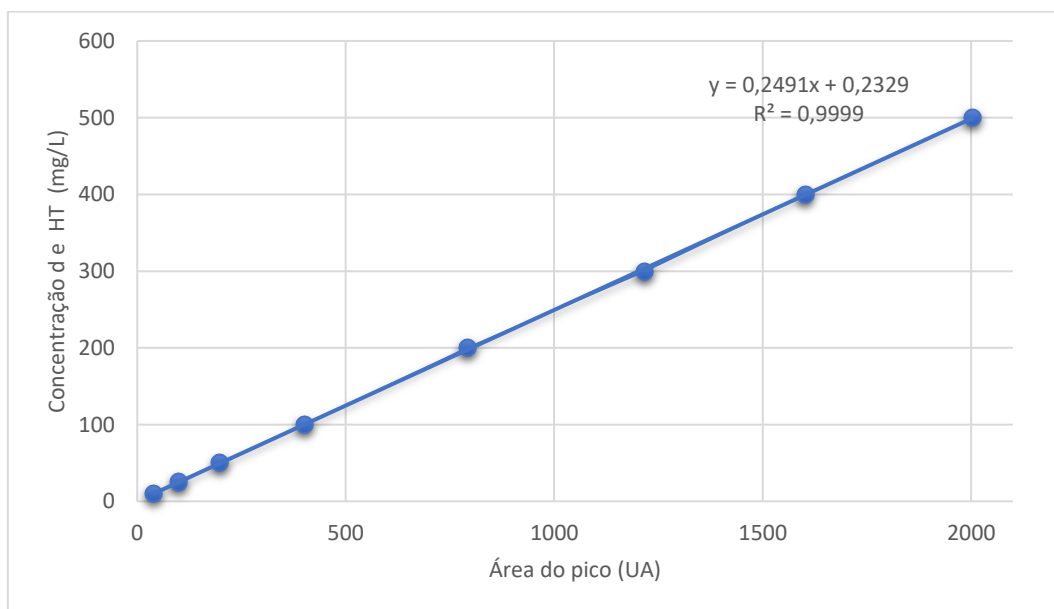


Figura 8.1 - Reta de calibração do padrão de hidroxitirosol.

Tabela 8.2 - Área dos picos correspondentes a concentrações do padrão de tirosol.

Concentração de Tirosol (mg/L)	Área dos picos (UA)
0	0
10	32,1
25	79,77
50	157,02
100	314,64
200	631,75
300	959,48
400	1276,41
500	1606,66

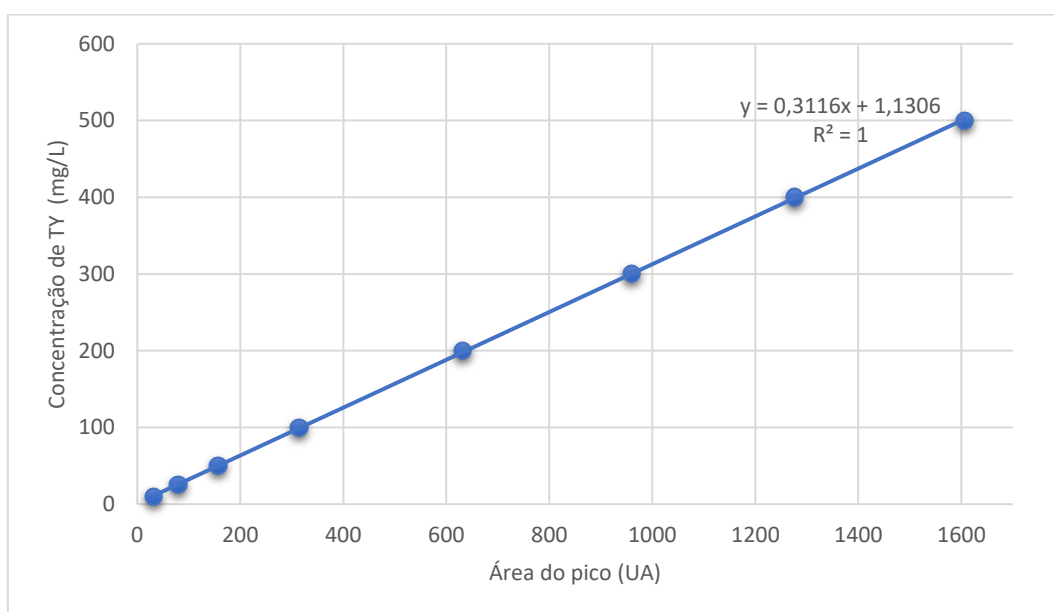


Figura 8.2 - Reta de calibração do padrão de tirosol.

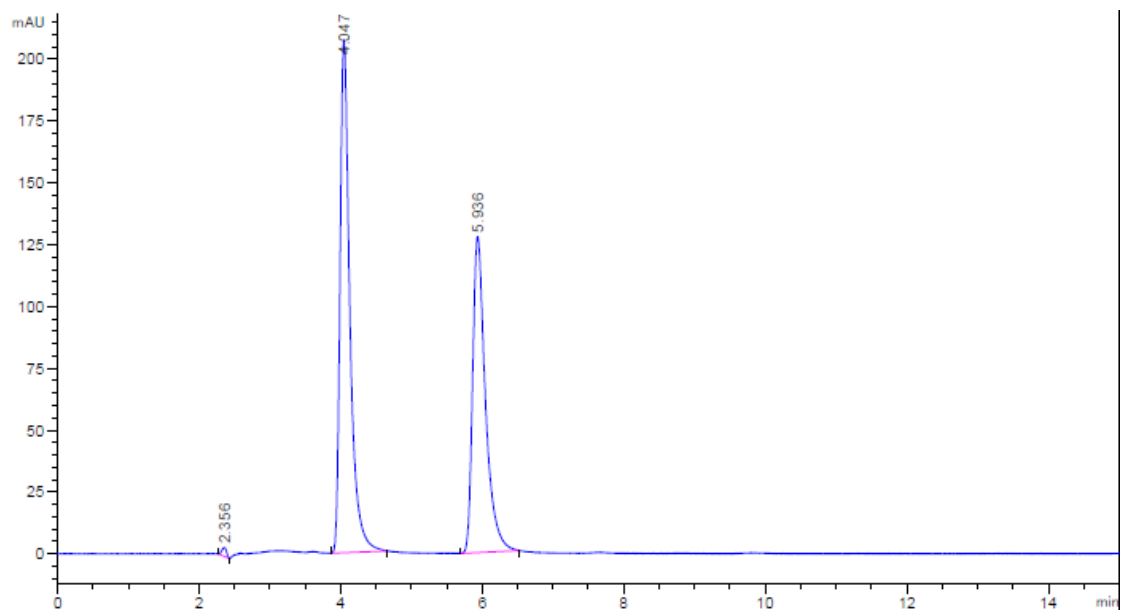


Figura 8.3 - Cromatograma de HPLC referente ao hidroxitirosol e tirosol.

B. Método de Folin-Ciocalteu e correlações

Tabela 8.3 - Absorvâncias medidas para concentrações conhecidas de ácido gálico preparadas em água.

Concentração de ácido gálico (mg/L)	Absorvâncias (a 750 nm)			Absorvância média (a 750 nm)
0	0,0000	-	-	0,0000
50	0,0591	0,0593	0,0591	0,0592
100	0,1156	0,1160	0,1159	0,1158
150	0,2262	0,2271	0,2262	0,2265
350	0,3832	0,3831	0,3825	0,3829
500	0,5109	0,5094	0,5095	0,5099
650	0,6499	0,6507	0,6520	0,6509
800	0,8049	0,8050	0,8045	0,8048
900	0,9754	0,9735	0,9743	0,9744
950	1,0174	1,0170	1,0158	1,0167

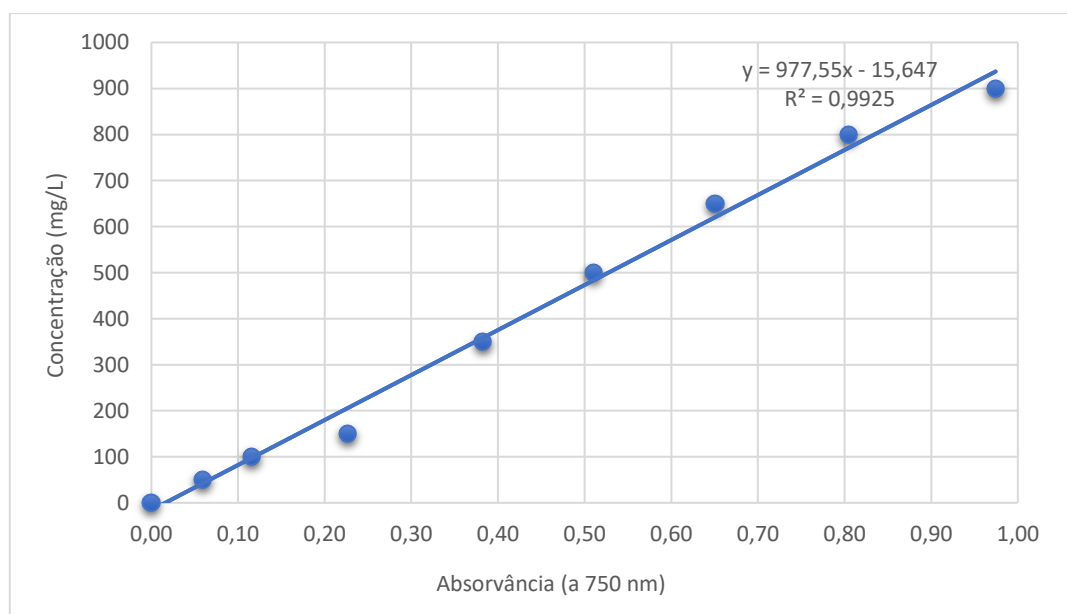


Figura 8.4 - Reta de calibração do ácido gálico preparada em água.

Tabela 8.4 - Absorvâncias medidas para concentrações conhecidas de ácido gálico preparadas na mistura de solventes BIOSOLVE 50.

Concentração de ácido gálico (mg/L)	Absorvâncias (a 750 nm)			Absorvância média (a 750 nm)
0	0,0000	-	-	0,0001
50	0,0706	0,0709	0,0718	0,0711
100	0,1277	0,1275	0,1278	0,1277
150	0,2263	0,2254	0,2276	0,2264
250	0,3325	0,3328	0,3332	0,3328
350	0,4235	0,4258	0,4255	0,4249
500	0,6188	0,6207	0,6206	0,6200
650	0,8083	0,8101	0,8105	0,8096
800	0,9747	0,9735	0,9745	0,9742

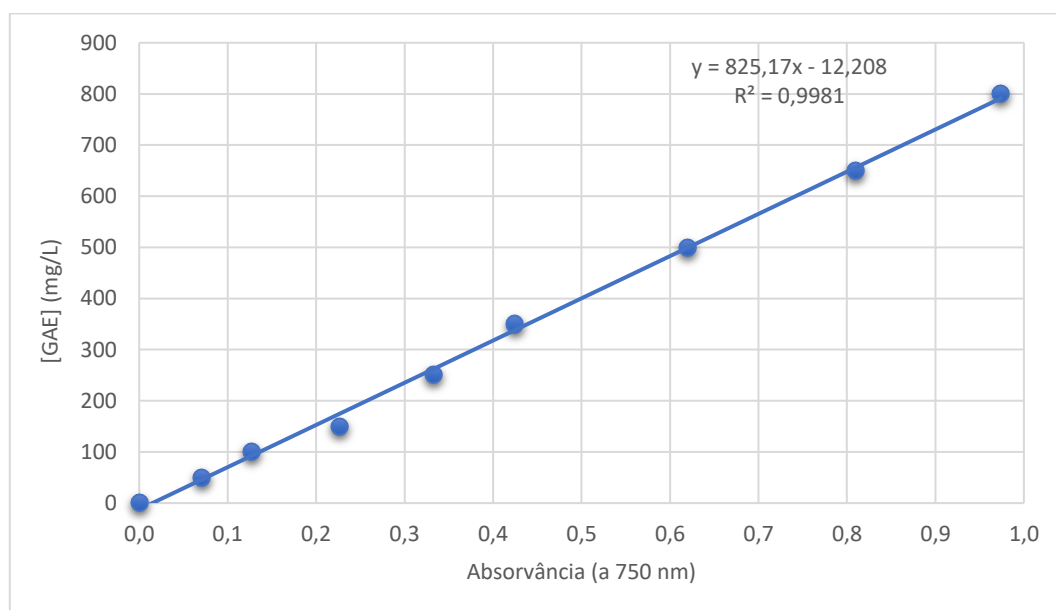


Figura 8.5 - Reta de calibração do ácido gálico preparada na mistura BIOSOLVE 50.

- Correlação entre as concentrações de fenóis totais e de hidroxitirosol para dessorvidos não evaporados: $y = 0,877x - 628.26$,com $R^2 = 0,977$;
- Correlação para amostras de “não adsorvido” do concentrado de osmose inversa :
 $y = 0.7932x$, com $R^2 = 0,9855$ (correlação para o HT);
- Correlação para amostras de “não adsorvido” do concentrado de osmose inversa :
 $y = 0.126x - 101,02$, com $R^2 = 0,953$ (correlação para o TY);
- Correlação para amostras de “dessorvido com água” : $y = 0,7088x$, com $R^2 = 0,991$ (correlação para o HT);
- Correlação para amostras de “dessorvido com água” : $y = 0,0922x - 8,8894$, com $R^2 = 0,9862$ (correlação para o TY);

C. Método de fenol-sulfúrico – Reta de calibração e concentração de amostras

Tabela 8.5 - Absorvâncias medidas para as concentrações conhecidas de glucose para a mistura BIOSOLVE 50.

Concentração (g/L)	Absorvâncias (a 490 nm)			Absorvância média (a 490 nm)
0,0000	0,0000	-	-	0,0000
0,0050	0,0897	0,0823	0,0819	0,0846
0,0100	0,1537	0,1523	0,1526	0,1529
0,0250	0,3140	0,3101	0,3093	0,3111
0,0500	0,5547	0,5542	0,5542	0,5544
0,0650	0,7348	0,7353	0,7350	0,7350
0,0850	0,9683	0,9658	0,9654	0,9665

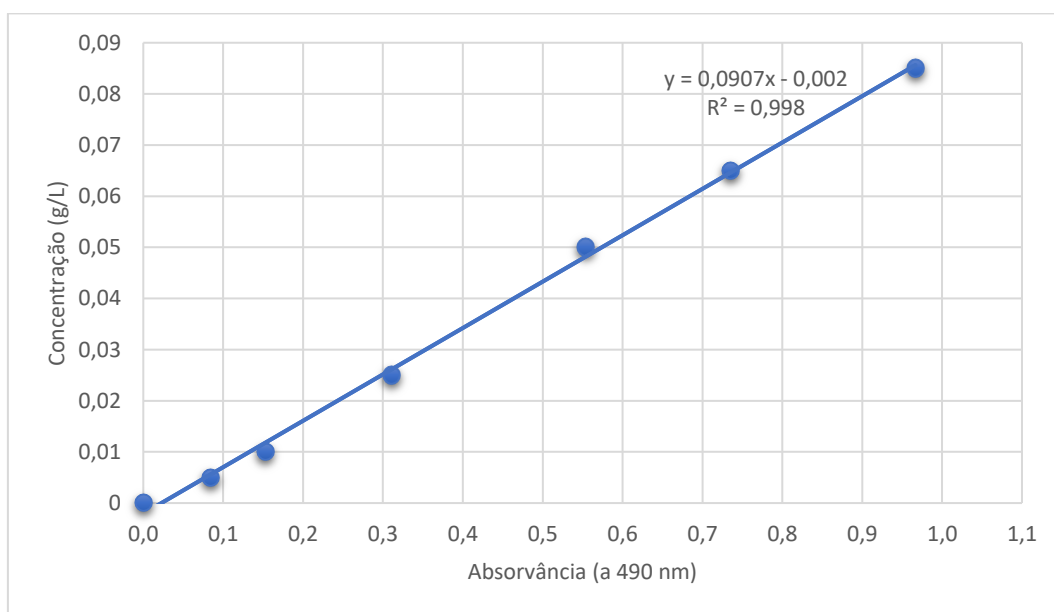


Figura 8.6 - Reta de calibração de glucose preparada na mistura BIOSOLVE 50.

Tabela 8.6 - Absorvâncias medidas para as concentrações conhecidas de glucose para a mistura BIOSOLVE 70.

Concentração (g/L)	Absorvâncias (a 490 nm)			Absorvância média (a 490 nm)
0,000	0,0000	-	-	0,0000
0,005	0,0879	0,0866	0,0870	0,0872
0,010	0,1463	0,1457	0,1460	0,1460
0,025	0,2909	0,2897	0,2889	0,2893
0,035	0,4787	0,4769	0,4769	0,4775
0,050	0,6491	0,6483	0,6483	0,6486
0,055	0,6603	0,6608	0,6606	0,6606
0,060	0,7497	0,7471	0,7471	0,7480
0,065	0,8504	0,8482	0,8488	0,8491
0,085	0,9457	0,9469	0,9465	0,9464

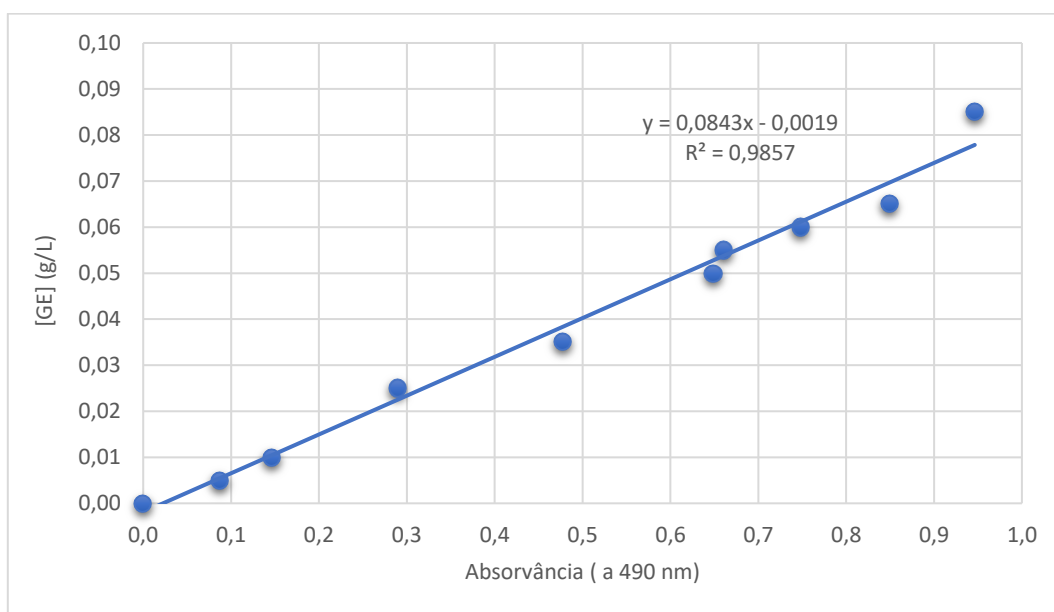


Figura 8.7 - Reta de calibração de glucose preparada na mistura BIOSOLVE 70.

Tabela 8.7 - Absorvâncias medidas para concentrações de glucose conhecidas preparadas em água.

Concentração (g/L)	Absorvâncias (a 490 nm)			Absorvância média (a 490 nm)
0,0000	0,0000	-	-	0,0000
0,0050	0,0446	0,0458	0,0456	0,0453
0,0100	0,1207	0,1202	0,1202	0,1204
0,0250	0,2176	0,2164	0,2164	0,2168
0,0350	0,3014	0,3003	0,2997	0,3005
0,0500	0,5209	0,5213	0,5209	0,5210
0,0650	0,6445	0,6450	0,6449	0,6448
0,0850	0,8233	0,8220	0,8235	0,8229
0,1000	0,9558	0,9542	0,9553	0,9551

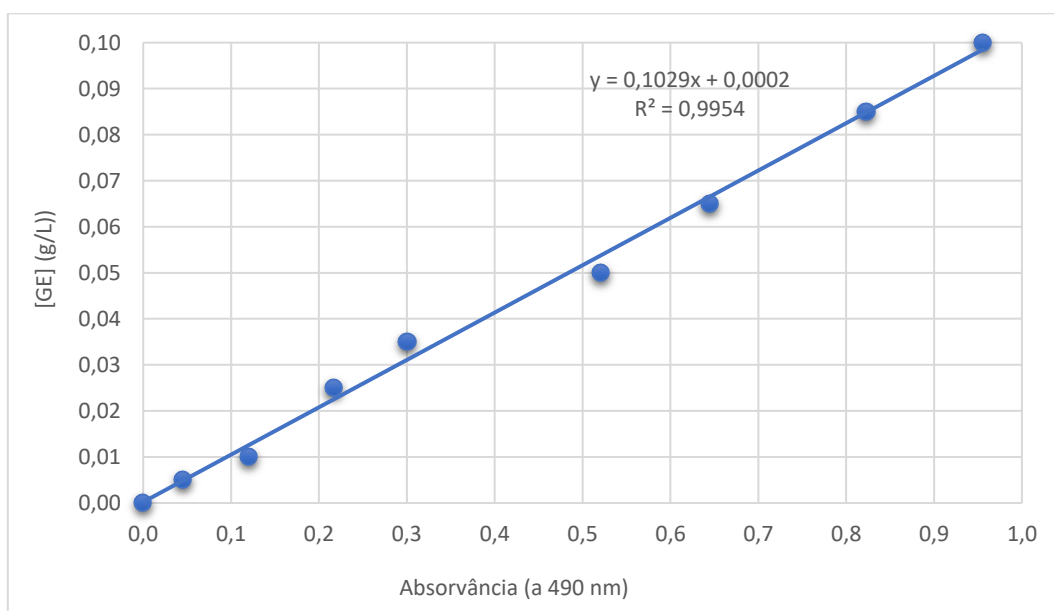


Figura 8.8 - Reta de calibração de glucose preparada em água.

D. Processo de adsorção/dessorção em batch

Tabela 8.8 - Média de absorvâncias, fenóis totais pelo método de Folin, HT e TY pelo método de HPLC e hidratos de carbono pelo método Fenol-Sulfúrico.

	Amostras	Método de Folin- Cicalteau				Método de HPLC		Método de Fenol Sulfúrico		
		Diluição	Absorvâncias médias	Fenóis totais (mg/L)	HT (mg/L)	HT (mg/L)	TY (mg/L)	Diluição	Absorvâncias médias	HC (g/L)
Ensaio 23	NADS	5	0,7115	3400	2697	2581	179	10	0,8167	0,8460
	DSSH ₂ O	2	0,5250	995	705	793	55	5	0,3789	0,1959
	BIODSS	5	0,4867	1945	1080	1908	258	2	0,4646	0,0803
Ensaio 24	NADS	5	0,5880	2796	2217	2016	144	20	0,8167	1,6848
	DSSH ₂ O	2	0,4493	847	600	647	49	6	0,6072	0,3761
	BIODSS	2	0,7523	1217	439	967	99	2	0,5199	0,0903
Ensaio 25	NADS	5	0,6593	3144	2494	2052	150	22	0,7148	1,6226
	DSSH ₂ O	2	0,5125	971	688	665	56	5	0,7185	0,3707
	BIODSS	6	0,6058	2926	1938	1970	298	3	0,5337	0,1392
Ensaio 26	NADS	5	0,5995	2852	2262	2119	150	20	0,6193	1,2786
	DSSH ₂ O	2	0,4379	825	585	641	50	4	0,6792	0,2804
	BIODSS	6	0,5864	2830	1854	2033	310	2	0,7369	0,1297
Ensaio 27	NADS	5	0,6989	3338	2648	2131	169	20	0,6151	1,2699
	DSSH ₂ O	2	0,4581	864	613	626	48	4	0,4892	0,2022
	BIODSS	6	0,5710	2754	1787	2211	335	2	0,7511	0,1322
Ensaio 28	NADS	5	0,6961	3324	2637	2173	147	20	0,6820	1,4076
	DSSH ₂ O	2	0,5087	963	683	623	48	5	0,4130	0,2135
	BIODSS	5	0,4867	*	*	*	*	2	0,4651	0,0804
Ensaio 29	NADS	5	0,6281	2992	2373	1907	138	20	0,6209	1,2817
	DSSH ₂ O	2	0,4402	829	588	590	44	4	0,4629	0,1913
	BIODSS	6	0,6045	2919	1933	2171	326	3	0,4787	0,1243

Tabela 8.9 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 23 realizado em modo batch.

Corrente	1	2	3	4	5	6	7	8	Retido
V total (L)	1,5	1,5	-	4,5	4,4	-	5,5	5,0	-
HT (mg/L)	13000	2581	-	0	793	-	0	1908	-
HT (g)	19,5	3,8	15,7	0	3,6	12,1	0	10,5	1,6
TY (mg/L)	2000	179	-	0	55	-	0	258	-
TY (g)	3,0	0,3	2,7	0	0,2	2,5	0	1,4	1,1
HC (mg/L)	2624	846	-	0	196	-	0	80	-
HC (g)	3,9	1,3	2,6	0	0,9	1,7	0	0,4	1,3

Tabela 8.10 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 24 realizado em modo batch.

Corrente	1	2	3	4	5	6	7	8	Retido
V total (L)	1,5	1,4	-	4,5	4,5	-	4,5	4,5	-
HT (mg/L)	13000	2016	-	0	647	-	0	967	-
HT (g)	19,5	2,8	16,7	0	2,9	13,8	0	4,4	9,4
TY (mg/L)	2000	144	-	0	49	-	0	99	-
TY (g)	3,0	0,2	2,8	0	0,2	2,6	0	0,4	2,2
HC (mg/L)	2624	1685	-	0	376	-	0	90	-
HC (g)	3,9	2,3	1,6	0	1,6	0	0	0	0

Tabela 8.11 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 25 realizado em modo batch.

Corrente	1	2	3	4	5	6	7	8	Retido
V total (L)	1,5	1,5	-	4,5	4,5	-	4,5	4,4	-
HT (mg/L)	13000	2052	-	0	665	-	0	1970	-
HT (g)	19,5	3,1	16,4	0	3,0	13,4	0	8,9	4,5
TY (mg/L)	2000	150	-	0	56	-	0	298	-
TY (g)	3,0	0,2	2,8	0	0,3	2,5	0	1,3	1,2
HC (mg/L)	2624	1623	-	0	371	-	0	139	-
HC (g)	3,9	2,4	1,5	0	1,5	0	0	0	0

Tabela 8.12 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 27 realizado em modo batch.

Corrente	1	2	3	4	5	6	7	8	Retido
V total (L)	1,5	1,5	-	4,5	4,5	-	4,5	4,2	-
HT (mg/L)	13000	2131	-	0	626	-	0	2211	-
HT (g)	19,5	3,2	16,3	0	2,8	13,5	0	9,9	3,6
TY (mg/L)	2000	169	-	0	48	-	0	335	-
TY (g)	3,0	0,3	2,7	0	0,2	2,5	0	1,5	1,0
HC (mg/L)	2624	1270	-	0	202	-	0	132	-
HC (g)	3,9	1,9	2,0	0	0,9	1,1	0	0,6	0,5

Tabela 8.13 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 28 realizado em modo batch.

Corrente	1	2	3	4	5	6	7	8	Retido
V total (L)	1,5	1,5	-	4,5	4,5	-	4,5	4,1	-
HT (mg/L)	13000	2173	-	0	623	-	0	1900*	-
HT (g)	19,5	3,3	16,2	0	2,8	13,4	0	8,6	4,8
TY (mg/L)	2000	147	-	0	48	-	0	300*	-
TY (g)	3,0	0,2	2,8	0	0,2	2,6	0	1,4	1,2
HC (mg/L)	2624	1408	-	0	213	-	0	80	-
HC (g)	3,9	2,1	1,8	0	1,0	0,8	0	0,3	0,5

*Assumido de um dos resultados anteriores devido à falta de recolha da amostra.

Tabela 8.14 - Balanço mássico ao processo de adsorção/dessorção, do ensaio 29 realizado em modo batch.

Corrente	1	2	3	4	5	6	7	8	Retido
V total (L)	1,5	1,5	-	4,5	4,5	-	4,5	4,2	-
HT (mg/L)	13000	1907	-	0	590	-	0	2171	-
HT (g)	19,5	2,9	16,6	0	2,7	13,9	0	9,8	4,1
TY (mg/L)	2000	138	-	0	44	-	0	326	-
TY (g)	3,0	0,2	2,8	0	0,2	2,6	0	1,5	1,1
HC (mg/L)	2624	1282	-	0	191	-	0	123	-
HC (g)	3,9	1,9	2,0	0	0,9	1,1	0	0,5	0,6

E. Processo de adsorção em semi- contínuo

Tabela 8.15 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 1 em coluna.

		Ensaio 1				
		Método Fenol-Sulfúrico			Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
ADS	NADS 40	10	0,4819	498	39	7
DSS H ₂ O	10	20	0,6941	1432	2650	7
	20	25	0,7787	2008	6978	0
	30	15	0,7959	1232	7210	69
	40	5	0,8801	454	5821	72
	50	5	0,4901	253	5170	86
	60	3	0,5632	174	4660	64
	70	2	0,5846	121	4285	72
	80	1	0,8201	85	3912	100

Tabela 8.16 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 3 em coluna.

		Ensaio 3				
		Método Fenol-Sulfúrico			Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
ADS	NADS 40	10	0,4349	450	20	5
DSSH ₂ O	10	30	0,5304	1643	6613	102
	20	5	0,5444	281	4232	128
	30	2	0,5639	116	3317	132
	40	1	0,5973	62	2664	145
	50	*	*	*	*	*
	60	1	0,2071	22	1649	130

*Amostra partiu-se

Tabela 8.17 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 4 em coluna.

		Ensaio 4				
		Método Fenol-Sulfúrico			Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
Adsorção	10	1	0,1337	14	37	7
	20	25	0,4725	1221	22	4
	30	40	0,6239	2576	23	5
	40	30	0,8815	2727	98	8
DSS BIOSOLVE 50	10	15	0,6561	863	1284	0
	20	25	0,5698	1242	6445	0
	30	40	0,7575	2668	39596	2707
	40	20	0,7895	1392	16783	3709
	50	20	0,3917	671	5359	1902
	60	10	0,5666	494	3426	1163
	80	10	0,4656	402	564	164
	100	2	0,4233	73	217	54
	120	1	0,5692	50	118	22
	150	1	0,3314	28	57	9
	180	1	0,3328	28	38	6

Tabela 8.18 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 5 em coluna.

		Ensaio 5				
		Método Fenol-Sulfúrico			Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
Adsorção	10	1	0,8331	86	9	3
	20	25	0,8183	2110	4	3
	30	40	0,7147	2950	5	0
	40	30	0,7891	2442	37	0
DSS BIOSOLVE 50	10	15	0,8842	726	1533	0
	20	25	0,6131	996	4797	75
	30	40	0,4344	1389	48704	7169
	40	20	0,5640	685	14517	3676
	50	20	0,7877	323	4192	1179
	60	10	0,5962	193	1532	410

Tabela 8.19 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 6 em coluna.

Ensaio 6						
	Método Fenol-Sulfúrico				Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
Adsorção	10	1	0,1133	12	21	3
	20	10	0,8033	829	12	5
	30	30	0,4619	1432	51	0
	40	35	0,7484	2702	761	1
	50	30	0,8123	2514	3265	81
	60	30	0,5105	1582	6922	126
	70	40	0,7263	2997	10009	377
	80	35	0,6654	2404	11371	584
	90	30	0,7059	2185	11333	783
	100	30	0,7609	2355	12389	1164
DSSH ₂ O	10	30	0,6821	2112	11798	1277
	20	30	0,7607	2354	12212	1573
	30	20	0,7535	1555	9570	1489
	40	10	0,4335	448	6592	1188
	50	10	0,5395	557	4936	1017
	60	2	0,9000	186	3896	884
	70	2	0,8514	176	3061	775
	80	1	0,6670	69	2500	688
DSS BIOSOLVE 50	10	1	0,8676	77	2145	646
	20	1	0,7278	64	1791	583
	30	5	0,6072	265	4018	2290
	40	10	0,6260	548	3580	3750
	50	8	0,4022	276	1362	1755
	60	5	0,4566	197	561	689
	70	2	0,8960	159	335	350
	80	2	0,4493	78	196	169

Tabela 8.20 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 7 em coluna.

Ensaio 7						
	Método Fenol-Sulfúrico				Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
Adsorção	10	1	0,0911	10	27	8
	20	15	0,6553	1014	20	7
	30	30	0,6650	2059	73	7
	40	35	0,6528	2358	975	35
	50	35	0,5739	2074	3905	76
	60	30	0,9184	2841	7507	141
	70	40	0,6705	2768	9967	324
	80	40	0,5708	2357	9586	651
	90	30	0,8638	2672	12045	870
	100	30	0,8723	2699	12763	1224
DSSH ₂ O	10	35	0,5663	2047	12227	1354
	20	30	0,9172	2837	11933	1508
	30	20	0,6381	1317	9257	1467
	40	10	0,7342	757	6342	1220
	50	6	0,4413	274	4585	100
	60	3	0,5992	186	3447	849
	70	2	0,4960	102	2721	762
	80	1	0,8578	88	2149	671
	90	1	0,5572	58	1756	581
	100	1	0,4715	49	1437	542
	110	1	0,3783	39	1187	511
	120	1	0,3577	37	1006	488
	130	1	0,3184	33	817	430
	140	1	0,2997	31	683	396
	150	1	0,2522	26	586	395
	160	1	0,2362	25	473	324
	170	1	0,2466	26	410	328
	180	1	0,2009	21	339	304
	190	1	0,1769	18	290	286
	200	1	0,1664	17	250	270

Tabela 8.21 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 8 em coluna.

Ensaio 8						
	Método Fenol-Sulfúrico				Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
Adsorção	0-20	7	0,8012	579	14	4
	20-100	40	0,7055	2912	7752	624
DSSH ₂ O	10	40	0,6605	2726	12987	1649
	20	40	0,6542	2701	11642	1556
	30	40	0,5246	2167	10039	1580
	40	30	0,4762	1476	8880	1526
	50	15	0,4299	667	6808	1334
	60	10	0,4759	492	5324	1070
	70	10	0,4521	467	4394	1041
	80	6	0,4334	269	3837	884
	90	2	0,8994	186	3258	886
	100	2	0,6772	140	2808	831
	110	2	0,5471	113	2426	770
	120	1	0,8430	87	2028	696
	130	1	0,7085	73	1767	674
	140	1	0,5490	57	1539	632
	150	1	0,4267	44	1362	606
	160	1	0,4038	42	1165	566
	170	1	0,3836	40	1036	527

Tabela 8.22 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 9 em coluna.

	Ensaio 9					
	Método Fenol-Sulfúrico				Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
Adsorção	10	-	-	-	-	-
	20	5	0,8083	417	8	2
	30	30	0,6915	2141	62	8
	40	35	0,8468	3057	855	16
	50	35	0,6609	2387	2880	61
	60	30	0,8749	2707	5843	117
	70	40	0,8453	3487	8235	346
	80	33	0,8877	3021	10117	598
DSSH ₂ O	10	40	0,7903	3261	11366	689
	20	35	0,6986	2523	11888	948
	30	30	0,4202	1303	9983	1135
	40	20	0,4349	899	7255	995
	50	8	0,5999	495	5406	858
	60	5	0,5592	289	4102	684
	70	2	0,7069	146	3409	702
	80	2	0,7033	145	2764	612
DSS BIOSOLVE 50	10	0,5	0,6336	33	2255	566
	20	1	0,7586	78	2004	569
	30	7	0,5043	306	5081	2806
	40	10	0,4891	424	3468	3737
	50	5	0,6157	269	1203	1746
	60	3	0,7034	185	489	737
	70	2	0,6647	117	228	320
	80	2	0,5605	98	117	147

Tabela 8.23 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 10 em coluna.

	Ensaio 10					
	Método Fenol-Sulfúrico				Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
Adsorção	10	1	0,0205	2	9	3
	20	5	0,8136	420	6	3
	30	25	0,6969	1798	6	5
	40	35	0,5135	1856	296	0
	50	35	0,5544	2004	2565	0
DSSH ₂ O	10	35	0,7333	2648	6474	118
	20	40	0,5154	2129	5033	233
	30	20	0,6614	1365	3842	204
	40	10	0,5191	536	5672	483
	50	3	0,9106	282	4516	377
	60	2	0,8199	169	3389	352
	70	2	0,6325	131	2732	371
	80	1	0,8174	84	2188	352
DSS BIOSOLVE 50	10	1	0,7422	65	1811	324
	20	1	0,7117	63	1756	384
	30	7	0,6354	389	5142	3289
	40	7	0,5015	304	2039	2442
	50	4	0,5424	189	591	861
	60	2	0,6345	111	173	247
	70	2	0,4134	71	107	104
	80	1	0,4782	41	56	40

Tabela 8.24 - Média das absorvâncias, hidratos de carbono pelo método Fenol- Sulfúrico, HT e TY pelo método de HPLC, para o ensaio 11 em coluna.

Ensaio 11						
	Método Fenol-Sulfúrico				Método de HPLC	
	Recolha	Diluição	Média das absorvâncias	[HC] (mg GE/L)	[HT] mg/L	[TY] mg/L
Adsorção	10	1	0,0159	2	2	1
	20	7	0,8033	580	0	0
	30	25	0,5920	1528	43	0
DSSH ₂ O	10	35	0,5540	2002	619	0
	20	40	0,5629	2325	3595	0
	30	20	0,6137	1267	4754	83
	40	10	0,5774	596	4067	111
	50	3	0,7160	222	3536	115
	60	2	0,6602	136	3395	108
	70	2	0,6372	132	2890	121
	80	1	0,8858	91	2920	162
DSS BIOSOLVE 50	10	1	0,5911	36	2152	151
	20	1	0,7053	52	2338	227
	30	7	0,5291	322	7594	2844
	40	5	0,5415	236	2890	2302
	50	2	0,7878	139	847	904
	60	2	0,4317	74	262	307
	70	1	0,6507	57	113	117
	80	1	0,4050	35	50	47